

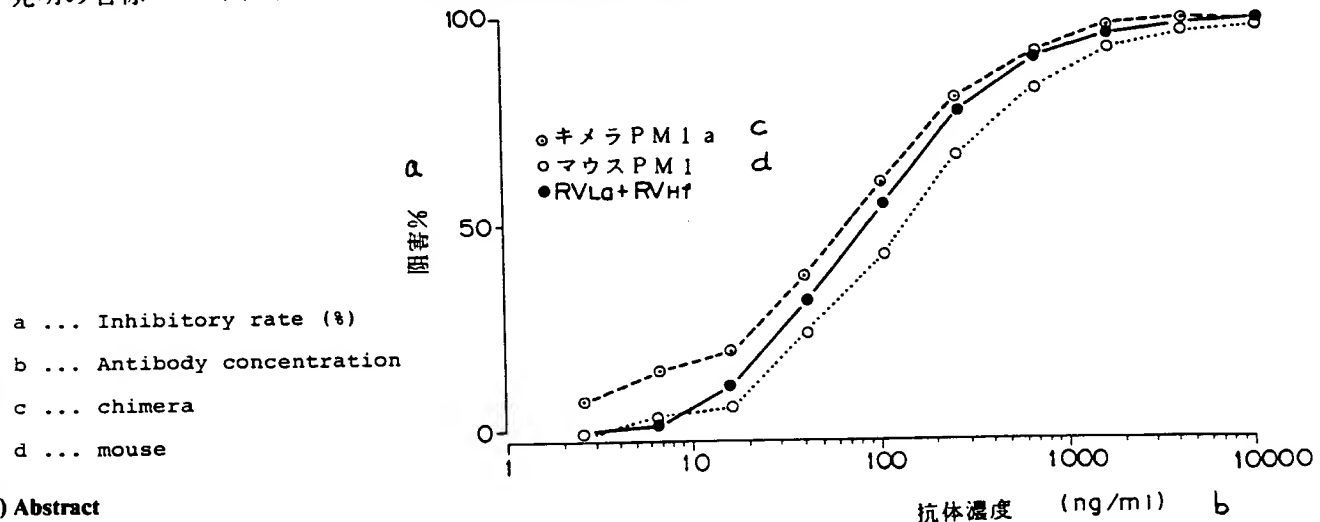


## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, C07K 15/28 C12N 15/13 // C12P 21/00 (C12P 21/08, C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 WO 92/19759
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP92/00544 1992年4月24日(24. 04. 92)		(43) 国際公開日 1992年11月12日(12. 11. 1992)	
(30) 優先権データ 特願平3/95476 1991年4月25日(25. 04. 91) JP 特願平4/32084 1992年2月19日(19. 02. 92) JP		(74) 代理人 弁理士 青木 朗, 外(AOKI, Akira et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)(JP/JP) 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT(欧州特許), AU, BB, BE(欧州特許), BF(OAPI特許), BG, BJ(OAPI特許), BR, CA, CF(OAPI特許), CG(OAPI特許), CH(欧州特許), CI(OAPI特許), CM(OAPI特許), CS, DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FI, FR(欧州特許), GA(OAPI特許), GB(欧州特許), GN(OAPI特許), GR(欧州特許), HU, IT(欧州特許), JP, KR, LK, LU(欧州特許), MC(欧州特許), MG, ML(OAPI特許), MN, MR(OAPI特許), MW, NL(欧州特許), NO, PL, RO, RU, SD, SE(欧州特許), SN(OAPI特許), TD(OAPI特許), TG(OAPI特許), US.	
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 土屋政幸(TSUCHIYA, Masayuki)(JP/JP) 佐藤 功(SATO, Koh)(JP/JP) 〒412 静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) ベンディグ, メアリー マーガレット (BENDIG, Mary Margaret)(GB/GB) ロンドン エスダブリュ6 1ティーエックス, ウェスト ハンプスナッド, ソレント ロード64 London, (GB) ジョーンズ, スティーブン タレン (JONES, Steven Tarran)(GB/GB) ハートフォードシャーシャー ダブリューディー7 8エイチエー, ラッドレット, ザ クローズ10 Hertfordshire, (GB)		添付公開書類 国際調査報告	

(54) Title : RECONSTITUTED HUMAN ANTIBODY AGAINST HUMAN INTERLEUKIN 6 RECEPTOR

(54) 発明の名称 ヒトインターロイキン-6受容体に対する再構成ヒト抗体



## (57) Abstract

A reconstituted human antibody against a human interleukin 6 receptor (IL-6R), which is composed of: (A) an L chain composed of (1) the C region of a human L chain and (2) the V region of an L chain comprising the framework region (FR) of a human L chain and the complementarity-determining region (CDR) of the L chain of a mouse monoclonal antibody against a human IL-6R, and (B) an H chain composed of (1) the C region of a human H chain and (2) the V region of an H chain comprising the FR of a human H chain and the CDR of the H chain of a mouse monoclonal antibody against a human IL-6R. Since most of the reconstituted human antibody originates in human antibodies and the CDR is lowly antigenic, this antibody is lowly antigenic against human and hence prospective as a therapeutic agent.

(57) 要約

(A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、及び、(2) ヒト L 鎖フレームワーク領域 (FR)、及びヒト IL-6 受容体 (IL-6R) に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖相補性決定領域 (CDR) を含んでなる L 鎖 V 領域、を含んで成る L 鎖；並びに、

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、及び、(2) ヒト H 鎖 FR、及びヒト IL-6R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 CDR を含んで成る H 鎖 V 領域、を含んで成る H 鎖；  
を含んで成るヒト IL-6R に対する再構成されたヒト抗体。

この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そして CDR は抗原性が低いから、本発明の再構成ヒト抗体は、ヒトに対する抗原性が低く、それ故に療法用として期待される。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第 1 頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
AU	オーストラリア	FR	フランス	MR	モリタニア
BB	バルバドス	GA	ガボン	MW	マラウイ
BE	ベルギー	GN	ギニア	NL	オランダ
BF	ブルキナファソ	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IE	アイルランド	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
ES	スペイン	ML	マリ		

## 明 細 書

ヒトインターロイキン-6受容体に対する再構成ヒト抗体

### 技 術 分 野

本発明は、ヒトインターロイキン-6受容体（IL-6R）に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体、ヒトライト鎖（L鎖）V領域及びヒトヘビー鎖（H鎖）V領域の相補性決定領域（CDR）がヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている再構成（reshaped）ヒト抗体に関する。本発明はさらに、上記の抗体又はその部分をコードするDNAを提供する。本発明はさらに、前記DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

### 背 景 技 術

インターロイキン-6（IL-6）は一連の細胞により生産される多機能サイトカインである。このものは免疫応答、急性期反応及び造血を調節し、そして宿主防御機構において中心的役割を演ずる。このものは広範な組織に作用して、標的細胞の性質に応じて成長誘導効果、成長阻害効果及び分化

誘導効果を発揮する。IL-6に対する特異的レセプター (IL-6R) は、IL-6の多機能性に従ってリンパ系細胞及び非リンパ系細胞上で発現される。IL-6遺伝子の異常発現が種々の疾患、特に自己免疫疾患、メサンジウム細胞増殖性糸球体腎炎、及び形質細胞腫／骨髄腫の発病に関与することが示唆されている (Hiranoら、*Immunol. Today*, 11, 443-449, 1990の総説を参照のこと)。ヒト骨髄腫細胞はIL-6を生産しそしてIL-6Rを発現することが観察される。実験において、IL-6に対する抗体が骨髄腫細胞の試験管内での増殖を阻害し、そしてそれ故にヒト骨髄腫の発癌においてオートクリン調節ループが機能していることが示された (Kawanoら、*Nature*, 332, 83, 1988)。

IL-6Rは種々の動物細胞の表面に存在し、そしてIL-6に特異的に結合し、そして細胞表面上のIL-6R分子の数が報告されている (Tagaら、*J. Exp. Med.*, 196, 967, 1987)。さらに、ヒトIL-6RをコードするcDNAがクローン化され、そしてIL-6Rの一次構造が報告されている (Yamasakiら、*Science*, 241, 825, 1988)。

マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性 (「抗原性」という場合もある) があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの療法的価値は制限される。ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短い。さらに、ヒト抗マウス抗体は、予定された効果を妨害するのみならず、患



者における不都合なアレルギー応答の危険をもたらす免疫応答を惹起することなくして頻回投与することはできない。

これらの問題を解決するため、ヒト型化 (humanized) 抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法は、可変領域がもとのマウスモノクローナル抗体に由来しそして定常領域が適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の完全な可変領域を含有し、そしてもとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することを期待することができる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来する蛋白質配列の比率が実質的に減少しており、そしてそれ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低いが、マウス可変領域に対する免疫応答がなお生ずる可能性がある (LoBuglioら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4220-4224, 1989)。

マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域からの相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) をヒト可変領域に移植して「再構成」(reshaped) ヒト可変領域を作製する。次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型

抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDRと極く一部のフレームワーク（FR）のみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されている。これらは種特異的配列を示さない。これらの理由のため、マウスCDRを担持する再構成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

前記のごとく、再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体は知られていない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法であって任意の特定の抗体に普遍的に適用し得る方法は存在しない。従って、特定の抗原に対する十分に活性な再構成ヒト抗体を作製するためには種々の工夫が必要である。ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体、すなわちPM1およびMT18は作製されており（特願平2-189420）、そして本発明者らはヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体AUK12-20、AUK64-7及びAUK146-15を調製しているが、本発明者らはヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の作製を示唆する文献を知らない。

さらに、ヒト骨髓腫細胞株が移植されたヌードマウスに、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体が注射された時腫瘍の増殖が顕著に阻害されることを、本発明者らは見出した。このことは、骨髓腫の治療のための療法剤として抗ヒトIL-6R抗体が有用であることを示唆している。従って本発明はヒトIL-6Rに対する、免疫原性の低い抗体を提供しようとするものである。

### 発 明 の 開 示

従って、本発明はヒト I L - 6 R に対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用なヒト/マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、再構成ヒト抗体の部分、並びに再構成ヒト抗体及びその部分並びにキメラ抗体の製造のための発現系を提供する。

さらに具体的には、本発明は、ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域；並びにヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を提供する。

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 C 領域、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域を含んで成る L 鎖；並びに

(2) ヒト H 鎖 C 領域、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を含んで成る H 鎖；  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対するキメラ抗体を提供する。

本発明はさらに、ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R；並びにヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R を提供する。

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (F R)、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト L 鎖 V 領域；並びに

(1) ヒト H 鎖 V 領域の F R、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖 V 領域を提供する。

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の C D R を含んで成る L 鎖 V 領域、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト L 鎖；並びに

(1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の C D R を含んで成る H 鎖 V 領域、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖を提供する。

本発明はさらにまた、

(A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト L 鎖 F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 C D R を含んで成る L 鎖；並びに

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖；  
を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。

本発明はまた、前記種々の抗体構成ポリペプチド、又はその部分をコードするDNAに関する。

本発明はまた、上記DNAを含んで成るベクター、例えば発現ベクターに関する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はさらにまた、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の抗体ペプチドの発現のために有用な、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）プロモーター／エンハンサー系を含んで成る発現ベクターを示す。

図2は、ヒトIL-6Rに結合する本発明のキメラ抗体AUK12-20の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

図3は、ヒトIL-6RへのヒトIL-6の結合を阻害する本発明のキメラ抗体AUK12-20の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

図4は、ヒトIL-6Rへの本発明のキメラ抗体PM1a

及びPM1bの結合についてのELISAの結果を示すグラフである。

図5は、ヒトIL-6RへのヒトIL-6の結合を阻害する本発明のキメラ抗体PM1a及びPM1bの能力を試験するELISAの結果を示すグラフである。

図6は、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

図7は、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

図8は、H鎖の発現のために有用な、ヒト・エロンゲーション・ファクター1 $\alpha$ （HEF-1 $\alpha$ ）プロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドHEF-12h-gr1の作製の過程を示す。

図9は、L鎖の発現のために有用な、HEF-1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサー系を含んで成る発現プラスミドHEF-12k-gkの作製の過程を示す。

図10は、H鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥SV40プロモーター／エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレダクターゼ（dhfr）及びHCMVプロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドDHF-R-PMh-gr1の作製の過程を示す。

図11は、H鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥SV40-プロモーター／エンハンサー配列に連結されたdhfr遺伝子及びEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを含んで成る発現プラスミドDHF-R- $\Delta$ E-RVh-PM1-

f の作製の過程を示す。

図 1 2 は、ヒト I L - 6 R への結合についての再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域のバージョン「a」及び「b」の能力を示すグラフである。

図 1 3 は、ヒト I L - 6 R への結合についての再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン「f」+再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」の能力を示すグラフである。

図 1 4 は、ヒト I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン「f」+再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」の能力を示すグラフである。

図 1 5 は、それぞれ L 鎖及び H 鎖の発現のために有用な、ヒト E F I -  $\alpha$  プロモーター/エンハンサーを含んで成る発現プラスミド H E F - V<sub>L</sub> - g k 及び H E F - V<sub>H</sub> - g r 1 を示す。

図 1 6 は、再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」をコードする D N A の作製の過程を示す。

図 1 7 は、ヒト I L - 6 R に結合する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 L 鎖 V 領域の能力の確認のための E L I S A の結果を示すグラフである。図中、標準 A U K 1 2 - 2 0 (キメラ) はキメラ A U K 1 2 - 2 0 抗体を C H O 細胞により大量に製造して精製したものについての結果を示す。

図 1 8 は、ヒト I L - 6 R に結合する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 (L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「b」)

の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

図19は、ヒトI L - 6 Rに結合する再構成ヒトA U K 1 2 - 2 0 抗体（L鎖バージョン「a」+H鎖バージョン「d」）の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

図20は、再構成ヒトs l e 1 2 2 0 H抗体H鎖V領域の化学合成の過程を示す。

図21は、ヒトI L - 6 RへのI L - 6の結合を阻害する再構成ヒトs l e 1 2 2 0 H抗体（L鎖バージョン「a」+H鎖バージョン「a」）の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

図22は、ヒトI L - 6 RへのI L - 6の結合を阻害する再構成ヒトs l e 1 2 2 0 抗体（L鎖バージョン「a」+H鎖バージョン「b」）の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

図23は、ヒトI L - 6 RへのI L - 6の結合を阻害する再構成ヒトs l e 1 2 2 0 抗体（L鎖バージョン「a」+H鎖バージョン「c」）の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

図24は、ヒトI L - 6 RへのI L - 6の結合を阻害する再構成ヒトs l e 1 2 2 0 抗体（L鎖バージョン「a」+H鎖バージョン「d」）の能力についてのE L I S Aの結果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

#### マウスV領域をコードするDNAのクローニング



さらに詳しくは、ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする D N A をクローン化するためには、遺伝子源として、ヒト I L - 6 R に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。この様なハイブリドーマとして、特願平 2 - 189420 号明細書にはモノクローナル抗体 P M 1 を生産するマウスハイブリドーマ P M 1 及び該抗体の性質が記載されている。本明細書の参考例 2 にハイブリドーマ P M 1 の作製方法を記載する。本発明者らは、それぞれがヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ A U K 1 2 - 2 0、A U K 6 4 - 7 及び A U K 1 4 6 - 1 5 を作製している。これらのハイブリドーマの作製方法は本明細書の参考例 3 に記載されている。

マウスモノクローナル抗体の可変領域をコードする目的の D N A をクローン化するためハイブリドーマ細胞を破壊し、そして C h i r g w i n ら、B i o c h e m i s t r y 18, 5294, 1977 に記載されている常法により全 R N A を得る。次に、この全 R N A を用いて、J. W. L a r r i c k ら、B i o t e c h n o l o g y, 7, 934, 1989 に記載されている方法を用いて一本鎖 c D N A を合成する。

次に、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法を用いて前記 c D N A の有意義な部分の特異的増幅を行う。マウスモノクローナル抗体のカッパ (κ) 型 L 鎖 V 領域の増幅のため、配列番号: 1 ~ 11 に示す 11 種のオリゴヌクレオチドプライマ

— (M o u s e   K a p p a   V a r i a b l e ; M K V )  
及び配列番号 : 1 2 に示すオリゴヌクレオチドプライマー  
( M o u s e   K a p p a   C o n s t a n t ; M K C ) を  
それぞれ 5' - 末端プライマー及び 3' - 末端プライマーと  
して使用する。前記 M K V プライマーはマウスカッパ型 L 鎖  
リーダー配列をコードする D N A 配列とハイブリダイズし、  
そして前記 M K C プライマーはマウスカッパ型 L 鎖 C 領域を  
コードする D N A 配列とハイブリダイズする。マウスモノク  
ローナル抗体の H 鎖 V 領域の増幅のため、配列番号 : 1 3 ~  
2 2 に示す 1 0 種のオリゴヌクレオチドプライマー ( M o u  
s e   H e a v y   V a r i a b l e ; M H V ) 及び配列番  
号 : 2 3 に示すオリゴヌクレオチドプライマー ( M o u s e  
H e a v y   C o n s t a n t ; M H C ) をそれぞれ 5'  
- 末端プライマー及び 3' - 末端プライマーとして使用する。

なお、5' - 末端プライマーはその 5' - 末端近傍に制限  
酵素 S a l I 切断部位を提供する配列 G T C G A C を含有し、  
そして 3' - 末端プライマーはその 5' - 末端近傍に制限酵  
素 X m a I 切断部位を提供するヌクレオチド配列 C C C G G  
G を含有する。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコー  
ドする目的の D N A 断片をクローニングベクターにサブクロ  
ーニングするために用いられる。

次に増幅生成物を制限酵素 S a l I 及び X m a I で切断さ  
せて、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコ  
ードする D N A 断片を得る。他方、プラスミド p U C 1 9 の  
ごとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素 S a l I

及び Xma I により切断させ、この pUC19 に前記 DNA 断片を連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードする DNA 断片を含むプラスミドを得る。

クローン化された DNA の配列決定は任意の常法に従って行うことができる。

目的とする DNA のクローン化及びその配列決定を実施例 1 ～ 3 に具体的に記載する。

#### 相補性決定領域 (CDR)

本発明はさらに、本発明の各 V 領域の超可変又は相補性決定領域 (CDR) を提供する。L 鎖及び H 鎖の各対の V 領域は抗原結合部位を形成する。L 鎖及び H 鎖上のこの領域は同様の全般的構造を有しそして各領域は配列の比較的保存された 4 個のフレームワーク領域を含み、それらは 3 個の超可変領域又は CDR により連結されている (Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1983)。前記 4 個のフレームワーク領域 (FR) の多くの部分は  $\beta$ -シート構造をとり、CDR はループを形成する。CDR はある場合には  $\beta$ -シート構造の一部を形成することもある。CDR は FR によって非常に近い位置に保持され、そして他の領域の CDR と共に抗原結合部位の形成に寄与する。本発明は、ヒト型化抗体の素材として有用なこれらの CDR、及びそれをコードする DNA をも提供する。

これらのCDR領域は、V領域の既知アミノ酸配列と照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができ、実施例4において具体的に説明する。

#### キメラ抗体の作製

ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確認める必要がある。この目的のため、キメラ抗体を作製した。さらに実施例1及び2に記載される4種類のモノクローナル抗体のクローン化されたDNAのヌクレオチド配列から推定されるマウス抗ヒトIL-6R抗体のアミノ酸配列を相互に、及び既知のマウス及びヒトの抗体のV領域と比較した。4種類のモノクローナル抗体のそれぞれについて、1セットの典型的な機能的マウスL及びH鎖V領域がクローニングされた。しかしながら、4種類すべてのマウス抗ヒトIL-6R抗体は比較的異なるV領域を有していた。4種類の抗体は相互に単に微小な相違ではなかった。クローン化されたマウスV領域を用いて4種類のキメラ抗ヒトIL-6R抗体を作製した。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、PCR-クローン化cDNAに見られるようなマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒトC領域をコードする配列に連結することを含んで成る。前記4種類のモノクローナル抗体の内、モノクローナル抗体

AUK12-20からのキメラ抗体の作製を実施例5に記載する。

モノクローナル抗体PM-1からのキメラ抗体の作製を実施例6に記載する。マウスPM-1 $\kappa$ L鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAを、ヒトL鎖C領域をコードするヒトゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてクローン化した。マウスPM-1抗体（単に「PM-1抗体」又は「PM」という場合もある）のH鎖リーダー及びV領域をコードするcDNAを、ヒト $\gamma$ -1C領域をコードするゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてサブクローン化した。特に設計されたPCRプライマーを用いて、マウスPM-1抗体のV領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な塩基配列を導入して（1）それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ（2）それらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たマウスPM-1抗体のV領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHCMV発現ベクター（図1）に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性（transient）発現又は安定な発現のために適当である。

マウスPM-1抗体中に存在するV領域と同じV領域を有するキメラPM-1抗体（バージョンa）の作製に加えて、キメラPM-1抗体の第二のバージョン（バージョンb）を作製した。キメラPM-1抗体（バージョンb）においては、

L鎖V領域中の位置107のアミノ酸がアスパラギンからリジンに変えられている。マウスPM-1抗体からのL鎖V領域と他のマウスL鎖V領域との比較において、位置107におけるアルギニンの存在は異常であることが注目された。マウス $\kappa$ L鎖V領域においては、位置107の最も典型的アミノ酸はリジンである。マウスPM-1抗体のL鎖V領域中の位置107に非典型的なアミノ酸であるアルギニンを有することの重要性を評価するため、位置107を典型的なアミノ酸であるリジンに変えた。この変更は、PCR-変異誘発法(M. Kammanら、Nuc l. A c i d s R e s . (1987) 17:5404)を用いてL鎖V領域をコードするDNA配列中に必要な変更を行うことにより達成された。

キメラPM-1抗体バージョン(a)はヒトIL-6Rに結合する活性を示した。キメラPM-1抗体バージョン(b)もバージョン(a)と同様にヒトIL-6Rに結合する。同様に、他の2種類のモノクローナル抗体AUK64-7及びAUK146-15からキメラ抗体を作製した。4種類すべてのキメラ抗体はヒトIL-6Rによく結合し、機能的測定において、正しいマウスV領域がクローン化されそして配列が決定されていたことが示された。

4種類のマウス抗ヒトIL-6R抗体から、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の設計及び作製のための第一の候補としてマウスPM-1抗体を選択した。マウスPM-1抗体の選択は主として、ヌードマウスに移植されたヒト骨髓腫細胞に対するマウス抗ヒトIL-6R抗体及びキメラ抗体の

効果を研究して得られた結果に基く。4種類のマウス抗ヒト I L - 6 R 抗体の内、P M - 1 抗体が最も強い抗腫瘍細胞活性を示した。又、キメラ P M - 1 抗体はキメラ A U K 1 2 - 2 0 抗体よりも強い抗腫瘍性を示した。

マウスモノクローナル抗体 P M - 1 の V 領域と既知のマウス及びヒトの抗体の V 領域との比較

マウスモノクローナル抗体の C D R がヒトモノクローナル抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体の F R とヒトモノクローナル抗体の F R との間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス P M - 1 抗体の L 鎖及び H 鎖の V 領域を、O W L ( o r L e e d s ) d a t a b a s e o f p r o t e i n s e q u e n c e s に見出されるすべての既知マウス及びヒトの V 領域と比較した。

マウス抗体の V 領域に関しては、P M - 1 抗体の L 鎖 V 領域はマウス抗体 m u s i g k c k o ( C h e n , H . T . ら、J . B i o l . C h e m . ( 1 9 8 7 ) 2 6 2 : 1 3 5 7 9 - 1 3 5 8 3 ) の L 鎖 V 領域と最も類似しており、93.5%の同一性 ( i d e n t i t y ) が存在した。P M - 1 抗体の H 鎖 V 領域はマウス抗体 m u s i g v h r 2 ( F . J . G r a n t ら、N u c l . A c i d s R e s . ( 1 9 8 7 ) 1 5 : 5 4 9 6 ) の H 鎖 V 領域に最も類似しており、84.0%の同一性が存在した。マウス P M - 1 抗体の V 領域は既知マウス V 領域に高比率の同一性を示し、マウス P M - 1 抗体の V 領域が典型的なマウス V 領域であることが示される。

このことはさらに、クローン化されたDNA配列が正しいという間接的な証明を与える。一般に、H鎖V領域間に比べてL鎖V領域間の方がより高い比率の同一性が存在する。これはおそらく、H鎖V領域に比べてL鎖V領域において一般的に観察されるより少ない量の多様性のためであろう。

ヒト抗体のV領域に関しては、マウスPM-1抗体のL鎖V領域は、REIとも称されるヒト抗体klhure (W. Palmら、Physiol. Chem. (1975) 356:167-191)のL鎖V領域に最も類似しており、72.2%の同一性が存在する。PM-1抗体のH鎖V領域は、ヒト抗体humighvap (VAP) (H. W. Schroederら、Science (1987) 238:791-793)に最も類似しており、71.8%の同一性が存在する。マウスPM-1抗体からの再構成抗体をいかに設計するかを考えるためにヒトV領域との比較が最も重要である。ヒトV領域への同一性の比率はマウスV領域への同一性の比率より低い。これはマウスPM-1抗体のV領域がマウスV領域に類似しており、そしてヒトV領域には類似していないことの間接的証明である。この証明にまた、ヒト患者における免疫原性の問題を解決するためにマウスPM-1のV領域をヒト型化する(humanize)ことが最善であることを示す。

マウスPM-1抗体のV領域をさらに、E.A. Kabatら、(1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Forth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Officeにより定義される。



ヒト V 領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列と比較した。V 領域の F R 間で比較を行った。その結果を表 1 に示す。

表 1

マウス PM-1 の V 領域の F R と、異なる種々のサブグループのヒト V 領域のコンセンサス配列<sup>(1)</sup>の F R との間の同一性 (%)

A. L 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III	H S G IV
70.1	53.3	60.7	59.8

B. H 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III
44.1	52.9	49.2

(1) コンセンサス配列は K a b a t ら (1987) に記載されている

マウス PM-1 抗体の L 鎖 V 領域の F R はヒト L 鎖 V 領域のサブグループ I (H S G I) のコンセンサス配列からの F R に最も類似しており、70.1%の同一性が存在する。マウス PM-1 の H 鎖 V 領域の F R はヒト H 鎖 V 領域のサブグループ II (H S G II) のコンセンサス配列からの F R に最も類似しており、52.9%の同一性が存在する。これらの結果は、既知のヒト抗体との比較から得られた結果を支持している。ヒト R E I 中の L 鎖 V 領域はヒト L 鎖 V 領域のサブグループ I に属し、そしてヒト V A P 中の H 鎖 V 領域はヒト H 鎖 V 領域のサブグループ II に属する。

ヒト抗体中のV領域とのこれらの比較から、再構成ヒトPM-1抗体のV領域の設計の基礎となるヒトV領域を選択することが可能である。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループI(HSGI)に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループII(HSGII)に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのが最善であろう。

#### 再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計

再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域を選択することであった。マウスPM-1抗体L鎖V領域中のFRは、サブグループIに属するヒト抗体L鎖V領域中のFRに最も類似していた(表1)。前記のごとく、マウスPM-1抗体のL鎖V領域と既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、それはヒトL鎖V領域のサブグループIの1構成員であるヒトL鎖V領域REIに最も類似していた。従って、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計においてREIからのFRを使用した。また、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の作製のための出発材料としてREIのFRを使用した。

REIに基くこれらのヒトFR中には、もとのヒトREIに比べて5個の相違が存在する(kabatら、1987、によれば位置39, 71, 104, 105及び107;表2を参照のこと)。FR4中の3個の変化(位置104, 105及び107)は他のヒトκL鎖からのJ領域に基いており、そしてそれ故にヒトからの逸脱を成すものではない(L. R

iechmannら、Nature (1988) 322 : 21-25)。位置39及び71における2個の変化はラットCAMPATH-1抗体のL鎖V領域のFR中に存在するアミノ酸にもどる変化であった(Riechmannら、1988)。

再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の2つのバージョンを設計した。第一のバージョン(バージョン「a」)においては、ヒトFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に存在するREIに基づくFR(Riechmannら、1988)と同一であり、そしてマウスCDRはマウスPM-1抗体のL鎖V領域中のCDRと同じであった。第二のバージョン(バージョン「b」)はバージョン「a」に基き、ヒトFR3中の位置71におけるアミノ酸1個のみを異にする。C. Chothiaら、J. Mol. Biol. (1987) 196 : 901-917により定義されるように、残基71はL鎖V領域のCDR1の標準的(canonical)構造の部分である。この位置のアミノ酸はL鎖V領域のCDR1ループの構造に直接影響すると予想され、そしてそれ故に抗体結合に大きく影響するであろう。マウスPM-1抗体のL鎖V領域において、位置71はチロシンである。再構成ヒトPM-1抗体のL鎖V領域のバージョン「a」の設計に使用した修飾されたREIのFRにおいては位置71はフェニルアラニンであった。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「b」においては、位置71のフェニルアラニンがマウスPM-1抗体L鎖V領域中に見出されるようにチロシ

ンに変えられている。表 2 は、マウス P M - 1 抗体の L 鎖 V 領域、再構成ヒト C A M P A T H - 1 H 抗体中での使用のために修飾された R E I の F R ( R i e c h m a n n ら、1988) 及び再構成ヒト P M - 1 抗体の L 鎖 V 領域の 2 種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

表 2

	FR1	CDR1
	12345678901234567890123	45678901234
V <sub>L</sub> PM-1	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISSYLN
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	
RV <sub>L</sub> a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQDISSYLN
RV <sub>L</sub> b	-----	-----
	FR2	CDR2
	567890123456789	0123456
V <sub>L</sub> PM-1	WYQQKPDGTIKLLIY	YTSRLHS
REI	WYQQKPGKAPKLLIY	
RV <sub>L</sub> a	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSRLHS
RV <sub>L</sub> b	-----	-----
	FR3	CDR3
	78901234567890123456789012345678	901234567
V <sub>L</sub> PM-1	GVPSRFGSGSGGTDYSLTINNLEQEDIATYFC	QQGNTLPYT
REI	GVPSRFGSGSGGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	
RV <sub>L</sub> a	GVPSRFGSGSGGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	QQGNTLPYT
RV <sub>L</sub> b	-----Y-----	-----
	FR4	
	8901234567	
V <sub>L</sub> PM-1	FGGGTKLEIN	
REI	FGQGTKVEIK	
RV <sub>L</sub> a	FGQGTKVEIK	
RV <sub>L</sub> b	-----	

注：REIのFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に見出されるものである（Riechmannら、1988）。REIのFR中の5個の下線を付したアミノ酸はヒトREIのアミノ酸配列（Plamら、1975；0. Eppら、Biochemistry（1975）14：4943-4952）から異なるアミノ酸である。マウスPM-1抗体のH鎖V領域中のFRはサブグループIIに属するヒトH鎖V領域に最も類似している（表1）。前記のごとく、マウスPM-1抗体のH鎖V領域と既知のヒトH鎖V領域との比較において、これはヒトH鎖V領域のサブグループIIの1構成員であるヒトH鎖V領域VAPに最も類似していた。ヒトH鎖V領域のサブグループIIの他の構成員であるヒトH鎖V領域NEWを、再構成ヒトPM-1抗体のH鎖V領域の作製のための出発材料として、及び再構成ヒトPM-1抗体のH鎖V領域の設計のための基礎として用いた。

再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の6種類のバージョンを設計した。6種類のバージョンのすべてにおいて、ヒトFRは再構成D1.3中に存在するNEW FRに基いており、そしてマウスCDRはマウスPM-1抗体H鎖V領域中のCDRと同じである。ヒトFR中の7個のアミノ酸残基（位置1, 27, 28, 29, 30, 48及び71；表3参照）は抗原結合に不都合な影響を与える可能性を有するものと同定されている。マウスPM-1抗体のV領域のモデルにおいて、H鎖V領域中の残基1はCDRループの近くに位置する表面残基である。残基27, 28, 29、及び30は、C. Ch

表 3

	FR1																											CDR1				
	1									2									3													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9					
V <sub>H</sub> PM-1	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	V	L	V	K	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	Y	S	I	T	SDHAW	
NEW	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	S	T	F	S		
RV <sub>H</sub> a	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	Y	T	F	T	SDHAW	
RV <sub>H</sub> b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	-	-	-	
RV <sub>H</sub> c	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	-	-	-	
RV <sub>H</sub> d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	-	-	-	
RV <sub>H</sub> e	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	-	-	-	
RV <sub>H</sub> f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	S	I	T	-	-	-

25

	FR2	CDR2
	4	5 6
	67890123456789	01223456789012345
V <sub>H</sub> PM-1	WIRQFPGNKLEWMG	YIS-YSGITTYNPSLKS
NEW	WVRQPPGGRGLEWIG	YIS-YSGITTYNPSLKS
RV <sub>Ha</sub>	WVRQPPGGRGLEWIG	-----
RV <sub>Hb</sub>	-----	-----
RV <sub>Hc</sub>	-----	-----
RV <sub>Hd</sub>	-----M-	-----
RV <sub>He</sub>	-----M-	-----1
RV <sub>Hf</sub>	-----	-----

	FR3
	7 8 9
	67890123456789012222345678901234
	ABC
V <sub>H</sub> PM-1	RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTGDTSTYYCAR
NEW	RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR
RV <sub>Ha</sub>	RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR
RV <sub>Hb</sub>	-----R-----
RV <sub>Hc</sub>	-----R-----
RV <sub>Hd</sub>	-----R-----
RV <sub>He</sub>	-----R-----
RV <sub>Hf</sub>	-----R-----

	CDR3	FR4
	10	11
	5678900012	34567890123
	AB	
V <sub>H</sub> PM-1	SLARTTAMDY	WGQGTSVTVSS
NEW	SLARTTAMDY	WGQGS�TVSS
RV <sub>Ha</sub>	SLARTTAMDY	WGQGS�TVSS
RV <sub>Hb</sub>	-----	-----
RV <sub>Hc</sub>	-----	-----
RV <sub>Hd</sub>	-----	-----
RV <sub>He</sub>	-----	-----
RV <sub>Hf</sub>	-----	-----

注：NEWのFRには再構成ヒトCAMPATH-1H抗体の第一バージョン（Riechmannら、1988）中に見出されるものである。

### 再構成ヒトPM-1抗体V領域をコードするDNAの作製

再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれの第一バージョンをコードするDNAを新規なPCR利用法を用いて作製した。要約すれば、適当なヒトFRをすでに含有する再構成ヒトV領域をコードするプラスミドをPCRプライマーを用いて修飾し、出発ヒトV領域中に存在するCDRをマウスPM-1抗体からのCDRにより置換した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域をコードするDNAの作製のための出発材料は、再構成ヒトD1.3L鎖V領域をコードするDNAを含有するプラスミドDNAであった。この再構成ヒトD1.3L鎖V領域はヒトL鎖V領域REI中に存在するFRに基づいて作製された。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAの作製のための出発材料は再構成ヒトD1.3H鎖V領域をコードするDNAであった。この再構成ヒトD1.3抗体H鎖V領域をコードするDNAはヒトH鎖V領域NEW(W. Verhoevenら、Science(1988)239:1534-1536)をコードするDNA中に存在するFRをコードするDNAに基づいて作製された。

所望のヒトFRをコードするDNAを含有する出発プラスミドDNAを選択した後、マウスD1.3CDRに代るマウスPM-1抗体CDRの置換を可能にするようにPCRプライマーを設計しそして合成した。各再構成ヒトPM-1抗体V領域につき、3種類のプライマーはマウスPM-1抗体CDRをコードするDNA配列を含有し、そして2種類のプラ



イマーは再構成ヒトV領域をコードする全体DNA配列を挟むように設計されている。一連のPCR反応における5種類のPCRプライマーの使用が、出発再構成ヒトV領域中に存在するヒトFRをコードするDNA及びマウスPM-1抗体V領域中に存在するCDRをコードするDNAから成るPCR生成物をもたらした（実施例7、並びに図7及び図8を参照のこと）。PCR生成物をクローン化し、そして配列決定して、再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のバージョン「a」の全体DNA配列が正しいアミノ酸配列をコードしていることを確認した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号55に示す。

再構成ヒトPM-1抗体V領域の他のバージョンをコードするDNAは、公表されているPCR-変異誘発法（Kammmanら、1989）にわずかな変更を加えた方法を用いて作製した。再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計に関して記載したように、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の1つの追加のバージョン（バージョン「b」）をコードするDNAを作製し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の5種類の追加のバージョン（バージョン「b」、「c」、「d」、「e」、及び「f」）をコードするDNAを作製した。これらの追加のバージョンは、第一バージョンからの一連の微細な変化を含む。アミノ酸配列のこれらの微細な変化はPCR変異誘発を用いてDNA配列の微細な変更を行うことにより達成された。DNA配列に必要な変化を導入するPCRプライマーが設計された。一連のPCR反応に続き、PCR生成物

をクローン化し、そして配列決定してDNA配列中の変化が計画通りに起っていることを確認した。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域バージョン「f」の配列を配列番号54に示す。

再構成ヒトPM-1抗体V領域の種々のバージョンのDNA配列を配列決定により確認した後、再構成ヒトPM-1抗体V領域をコードするDNAを、ヒトC領域をコードするDNAをすでに含有する哺乳類細胞発現ベクターにサブクロニングした。再構成ヒトPM-1抗体V鎖L領域をコードするDNAをヒトL鎖C領域をコードするDNA配列に連結した。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAをヒト $\gamma$ -1C領域をコードするDNA配列に連結した。再構成ヒトPM-1抗体のより高レベルの発現を達成するため、図1に示すようなHCMV発現ベクターを修飾して、HCMVプロモーター・エンハンサー領域をヒトエロンゲーションファクター(human elongation factor; HEF-1 $\alpha$ )プロモーター・エンハンサーにより置き換えた(図15を参照のこと)。

次に再構成ヒトL鎖V領域バージョン(a)と、H鎖V領域バージョン(a)～(f)のすべての組合せをヒトIL-6Rへの結合について試験し、そしてその結果、実施例11に詳細に記載するように、L鎖バージョン(a)とH鎖バージョン(f)とを含んで成る再構成ヒト抗体がキメラPM-1抗体(a)と同じレベルでIL-6Rに結合する能力を示した。

発現のレベルを改良するための、再構成ヒトPM-1抗体  
V領域をコードするDNAの変更

COS細胞中で生産される再構成ヒトPM-1抗体の発現レベルの検討において、再構成ヒトH鎖の発現が常に、再構成ヒトL鎖又はキメラL鎖もしくはH鎖の発現レベルに比べて約10分の1であることが明らかになった。低レベルの発現を生じさせる問題点は再構成ヒトH鎖V領域にあるようであった。低レベルの発現が低レベルの転写の結果であるか否かを特定するため、再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクターにより同時形質転換されたCOS細胞からRNAを調製した。マウスPM-1抗体V領域をコードするDNAのPCRクローニングについて記載したようにして一本鎖cDNAを合成した。再構成ヒトL鎖又はH鎖V領域をコードするDNA配列の両端を挟むように設計されたPCRプライマーを用いて、再構成ヒトL鎖V領域又は再構成H鎖V領域に対応する前記一本鎖cDNAからPCR生成物を生成せしめた。

再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNAについて、2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り408bpの長さを有し、他方はより短い299bpのPCR生成物であった。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約90%を占め、そして短いPCR生成物は全生成量の約10%を占めた。再構成ヒトH鎖V領域についてもやはり2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り444bpの長さを有し、そして他方は370bpの長さの短いPCR生成物であ

った。しかしながらこの場合、正しくない短い方のPCR生成物がPCR生成物の全生成量の大部分、すなわち約90%を占めた。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約10%に過ぎなかった。これらの結果は、再構成ヒトV領域をコードするRNAの幾らかが欠失を含むことを示した。

どの配列が除去されたかを決定するため、短い方のPCR生成物をクローニングし、そして配列決定した。DNA配列から、L鎖及びH鎖V領域のいずれについてもDNAの特定の部分が欠けていることが明らかになった。除去された配列を挟むDNA配列の検討により、これらの配列はスプライスドナー-アクセプター配列のコンセンサス配列(Breathnach, R. & Annu. Rev. Biochem. (1981) 50:349-383)に相当することが明らかとなった。再構成ヒトH鎖の低い発現レベルは、再構成ヒトH鎖V領域の設計が、どちらかと言えば効果的なスプライスドナー-アクセプター部位を不注意に形成させたためであると説明された。さらに、再構成ヒトL鎖V領域の設計はどちらかと言えば非効果的なスプライスドナー-アクセプター部位を不注意に形成させたようであった。これらのスプライスドナー-アクセプター部位を除去するため、ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれバージョン「a」及び「f」をコードするDNA配列のわずかな変更を前記のPCR-変異誘発法を用いて行った。

低下した発現レベルの原因は、再構成ヒトL鎖及びH鎖V

領域（配列番号：54及び55）の両者のリーダー配列をコードするDNA中のイントロンの存在であると考えられた。これらのイントロンはもともと、再構成ヒトD1.3抗体のV領域（Verhoevenら、1988）をコードするDNAの作製において使用されたマウス $\mu$ H鎖リーダー配列（M. S. Neubergerら、Nature（1985）314：268-270）をコードするDNAに由来する。再構成ヒトD1.3抗体をコードするDNAは、マウス免疫グロブリンプロモーターを用いる哺乳類細胞ベクターにおいて発現されたためマウスリーダーイントロンの存在が重要であった。リーダーイントロンは免疫グロブリンプロモーターからの発現のためには重要であるが、しかしHCMVのごときウィルスプロモーターからの発現のためには重要でない（M. S. Neubergerら、Nucl. Acids Res.（1988）16：6713-6724）配列を含有している。再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖をコードするDNAが免疫グロブリンプロモーター以外のプロモーターを用いるベクターにおいて発現される場合、リーダー配列中のイントロンは、再構成ヒトV領域をコードするDNAのPCRクローニングにより除去された（実施例12を参照のこと）。

低下した発現レベルの他の可能性ある原因は、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAとヒト $\gamma$ -1C領域をコードするDNAとの間のイントロン内の約190bpの非機能的DNAの存在であると考えられた。再構成ヒトB

I-8 H鎖V領域 (P. T. Jonesら、Nature (1986) 321: 522-525) をコードするDNAにもともと由来するDNA配列から再構成ヒトPM-1 H鎖V領域をコードするDNAを作製した。この最初の再構成ヒトV領域をコードするDNAはマウスNPのH鎖V領域 (M. S. Neubergerら、Nature; M. S. Neubergerら、EMBO J. (1983) 2: 1373-1378) をコードするDNAから作製された。再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNAと、発現ベクターに再構成ヒトV領域をコードするDNAを連結するためのBamHI部位との間のイントロン中に存在する約190bpのこのストレッチは、再構成ヒトV領域をコードするDNAのPCRクローニングの過程で除去された。

発現レベルを改良するために変形された再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域の最終バージョンのDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号: 57及び56に示す。これらのDNA配列は、表2に示した再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」、並びに表3に示した再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のバージョン「f」をコードする。HEF-1 $\alpha$ 発現ベクター (図15) に挿入された場合、これらのベクターはトランスフェクトされたCOS細胞中で約2 $\mu$ g/mlの抗体を一過性に生産する。より多量の再構成ヒトPM-1抗体を安定的に生産させるため、dhfr遺伝子を組み込んだ新しいHEF-1 $\alpha$ 発現ベクターを作製した (実施例10及び図11を参照のこと)。欠陥のある (crip

pled) SV40プロモーターを連結した dhfr 遺伝子を、ヒト  $\gamma$ -1 H鎖を発現する HCMV ベクターについて記載したのと同様にして、ヒト  $\gamma$ -1 H鎖を発現する HEF-1  $\alpha$  ベクターに導入した。再構成ヒト PM-1 抗体 L鎖を発現する HEF-1  $\alpha$  ベクター及び再構成ヒト PM-1 抗体 H鎖を発現する HEF-1  $\alpha$ -dhfr ベクターを CHO dhfr (-) 細胞に同時形質転換した。安定に形質転換された CHO 細胞系を、ヌクレオシドを含有せず 10% の FCS 及び 500  $\mu$ g/ml の G418 を含有する Alpha-Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) 中で選択した。遺伝子増幅工程に先立って、CHO 細胞系は 10  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 細胞/日までの再構成ヒト PM-1 抗体を生産することが観察された。

マウスモノクローナル抗体 AUK 12-20 の V 領域と既知のヒト抗体の V 領域との比較

マウスモノクローナル抗体 AUK 12-20 のカッパー L鎖 ( $\kappa$  L) V 領域の FR とヒト  $\kappa$  L 鎖 V 領域のサブグループ (HSG) I ~ IV の FR との相同性、及びマウスモノクローナル抗体 AUK 12-20 の H 鎖 V 領域の FR とヒト H 鎖 V 領域のサブグループ (HSG) I ~ III の FR との相同性を表 4 に示す。

表 4

マウス A U K 1 2 - 2 0 抗体の V 領域の F R と異なる種々のサブグループのヒト V 領域のコンセンサス配列の F R との間の同一性 (%)

## A. L 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III	H S G IV
6 5 . 8	6 4 . 0	6 7 . 6	6 7 . 6

## B. H 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III
5 8 . 6	3 5 . 3	4 9 . 1

表 4 に示した様に、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 のカッパー L 鎖 ( $\kappa$  L) V 領域は、ヒト  $\kappa$  L 鎖 V 領域のサブグループ (H S G) I ~ IV とそれぞれ同程度 (6 4 ~ 6 8 %) の相同性を示す。タンパクの D a t a b a s e " L E E D S " の検索より、H S G - IV に属するヒト抗体 L e n (M. S c h n e i d e r ら、P h y s i o l . C h e m . 3 5 6 , 5 0 7 - 5 5 7 , 1 9 7 5) の L 鎖 V 領域が最も高い 6 8 % の相同性を示す。一方、マウスモノクローナル抗体 P M - 1 のヒト型化に用いられているヒト抗体 R E I は H S G - I に属し、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 の L 鎖 V 領域とは、6 2 % の相同性を示す。またマウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 の L 鎖の c a n o n i c a l 構造を調べてみると (C. C h o t h i a ら、J. M o l . B i o l . (1 9 8 7) 1 9 6 : 9 0 1 ~ 9 1 7) 、特に L 2 が L e n より R E I とよく一致する。



上記により、マウスモノクローナル抗体AUK12-20のL鎖V領域のヒト型化に用いるヒト抗体は必ずしもHSG-IVに属する抗体から選ぶ必要もなく、マウスモノクローナル抗体AUK12-20のL鎖V領域のヒト型化には、マウスモノクローナル抗体PM-1のL鎖V領域のヒト型化の場合と同様にREIを用いる。

表4に示す様に、AUK12-20抗体のH鎖V領域は、ヒトH鎖V領域のサブグループI(HSGI)と最も高い相同性を示す。また、Database "LEEDS"の検索により、やはりHSGIに属するヒト抗体HAX(Stollar, B. D. et al. J. Immunol. 139, 2496-2501, 1987)がAUK12-20抗体のH鎖V領域に対して約66%の相同性を示す。そこで再構成ヒトAUK12-20抗体のH鎖V領域の設計においては、HSGIに属するヒト抗体HAXのFR、及び同様にHSGIに属するFRを含有するヒト型化425抗体H鎖V領域(Kettleborough C. A., et al. Protein Engineering, 4, 773-783, 1991)のFRを用いる。ちなみに、AUK12-20抗体H鎖V領域はヒト型化425抗体H鎖V領域のバージョンaと約64%の相同性を示す。

#### 再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域の設計

前記の理由により再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域のFRとしてREIのFRを使用し、表5に示すように再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域を設計した。

36

## 表 5

	FR1										CDR1			
	1					2					3			
	1234567890	1234567890	123								4567777890	1234		
V <sub>L</sub> AUK12-20	DIVLTQSPASLGVS	LGQRATISC									ABCD			
REI	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVTITC									RASKSVSTSGYSYMH			
RV <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVTITC									RASKSVSTSGYSYMH			
	FR2								CDR2					
	4				5				5					
	567890	123456789							0123456					
V <sub>L</sub> AUK12-20	WYQQKPGQTPKLLIY								ASNLES					
REI	WYQQTPGKAPKLLIY													
RV <sub>L</sub>	WYQQKPGKAPKLLIY								ASNLES					
	FR3												CDR3	
	6				7				8				9	
	7890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	901234567	
V <sub>L</sub> AUK12-20	GVPARFSGSGSGT	DFTLNHPVEEEDA	ATYYC										QHSRENPYT	
REI	GVPSRFSGSGSGT	DYFTFTISSLPEDI	ATYYC										QHSRENPYT	
RV <sub>L</sub>	GVPSRFSGSGSGT	DFTFTFTISSLPEDI	ATYYC										QHSRENPYT	
	FR4													
	10													
	890	1234567												
V <sub>L</sub> AUK12-20	FGGGTKLEIK													
REI	FGGGTKLQIT													
RV <sub>L</sub>	FGGGTKVEIK													

注：アンダーラインを付した5個のヌクレオチドはCAM  
PATH-1H抗体の設計において変えられたものである  
(表2の注を参照のこと)。

さらに、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域のバージョンb～dを設計した。バージョンa～dのアミノ酸配列を表6に示す。

表 6

	FR1												CDR1																	
	1				2				3																					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4														
V <sub>H</sub> AUK12-20	E	I	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T
HSGI	Z	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	X	S	V	X	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S
RV <sub>Ha</sub>	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T
RV <sub>Hb</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RV <sub>Hc</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RV <sub>Hd</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	FR2	CDR2
	4	5 6
	67890123456789	01223456789012345
		A
V <sub>H</sub> AUK12-20	WVKQSHGKSLEWIG	YIDPFNGGTSYNQKFKG
HSGI	WVRQAPGXGLEWVG	
RV <sub>Ha</sub>	WVRQAPGQGLEWVG	YIDPFNGGTSYNQKFKG
RV <sub>Hb</sub>	-----	-----
RV <sub>Hc</sub>	-----I-	-----
RV <sub>Hd</sub>	-----I-	-----

	FR3
	7 8 9
	67890123456789012222345678901234
	ABC
V <sub>H</sub> AUK12-20	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR
HSGI	RVTXTDXSXNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
RV <sub>Ha</sub>	RVTMTLDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
RV <sub>Hb</sub>	K---V-----
RV <sub>Hc</sub>	-----
RV <sub>Hd</sub>	K---V-----

	CDR3	FR4
	10	11
	5678900012	34567890123
	AB	
V <sub>H</sub> AUK12-20	GGN-RF--AY	WGQGTILVTVSA
HSGI		WGQGTILVTVSS
RV <sub>Ha</sub>	GGN-RF--AY	WGQGTILVTVSS
RV <sub>Hb</sub>	-----	-----
RV <sub>Hc</sub>	-----	-----
RV <sub>Hd</sub>	-----	-----

注：ヒトサブグループ I V<sub>H</sub> 領域 (HSGI) において 1 種類の共通アミノ酸が特定できない位置は X で示す。アンダーラインを付した 2 個のアミノ酸は HSGI コンセンサス配列中のアミノ酸と異なる。RV<sub>Hb</sub>, RV<sub>Hc</sub> 及び RV<sub>Hd</sub> については RV<sub>Ha</sub> と異なるアミノ酸残基のみが示してある。

さらに、ヒト抗体 HAX (J. Immunology 139, 2496-2501, 1987, SLE 患者由来 B 細胞)

表 7

	FR1												CDR1																	
	1				2				3																					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4														
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4														
V <sub>H</sub> AUK12-20	E	I	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T
HAX	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T
sle:	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T
1220Ha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1220Hb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1220Hc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1220Hd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

```

FR2
4
67890123456789
VH AUK12-20
HAX
sle:
1220Ha
1220Hb
1220Hc
1220Hd
WVKQSHGKSLEWIG
WVRQAPGQRLEWMG
WVRQAPGQRLEWMG
-----I-
-----I-
CDR2
5
6
0122223456789012345
ABC
YIDP--FNGGTSYNQKFKG
YIDP--FNGGTSYNQKFKG
-----
-----
-----
-----

```

	7	8	9
	FR3		
	67890123456789012222345678901234		
		ABC	
V <sub>H</sub> AUK12-20	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR		
HAX	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR		
sle:			
1220Ha	RVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR		
1220Hb	-----V-----		
1220Hc	K-----V-----		
1220Hd	K-----V-----		

	CDR3	FR4
	10	11
	5678900012	34567890123
	AB	
V <sub>H</sub> AUK12-20	GGN-RF--AY	WGQGTTLVTVSA
HAX		WGQGTTLVTVSS
sle:		
1220Ha	GGN-RF--AY	WGQGTTLVTVSS
1220Hb	-----	-----
1220Hc	-----	-----
1220Hd	-----	-----

注：s l e 1 2 2 0 H a 中のアンダーラインを付した2個の残基はH A XのF Rからの変化を示す。s l e 1 2 2 0 H b, s l e 1 2 2 0 H c、及びs l e 1 2 2 0 H dについてはH A XのF R中のアミノ酸と異なるF R中のアミノ酸のみを示す。

ヒトI L - 6 Rに対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えばC O S細胞又はC H O細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用の

プロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期 (human cytomegalovirus immediate early; HCMV) プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>r</sub>1、HCMV-V<sub>L</sub>-HC<sub>κ</sub>、HCMV-12h-gr1、HCMV-12κ-gκ等であって、pSV2neoに由来するもの(図1を参照のこと)が含まれる。

本発明のために有用なプロモーターの他の具体例はヒト・エロンゲーション・ファクター1α (HEF-1α) プロモーターである。このプロモーターを含有する発現ベクターにはHEF-12h-gr1及びHEF-12κ-gκ(図8及び図9)、並びにHEF-V<sub>H</sub>-gr1及びHEF-V<sub>L</sub>-gκ(図15)が含まれる。

宿主細胞系中での遺伝子増幅のため、発現ベクターはさらにdhfr遺伝子を含有することができる。dhfr遺伝子を含有する発現ベクターは例えばDHFR-ΔE-PMh-gr1(図10)、DHFR-ΔE-RVh-PM1-f(図11)等である。

要約すれば、本発明はまず、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及びH鎖V領域、並びに該L鎖V領域をコードするDNA及びH鎖V領域をコードするDNAを提供する。これらは、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体及び再構成ヒト抗体の作製のために有用である。モノクローナル抗体は、例えばAUK12-20、

PM-1、AUK 64-7、及びAUK 146-15である。  
L鎖V領域は例えば配列番号：24，26，28又は30に示すアミノ酸配列を有し、そしてH鎖V領域は例えば配列番号：25，27，29，又は31に示すアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列は例えばそれぞれ配列番号：24～31に示すヌクレオチド配列によりコードされている。

本発明はまた、

(1) ヒトL鎖C領域及びマウスL鎖V領域；並びに

(2) ヒトH鎖C領域及びマウスH鎖V領域；

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体に関する。マウスL鎖V領域及びマウスH鎖V領域並びにこれらをコードするDNAは前記の通りである。前記ヒトL鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、そして例えばヒトκC領域である。前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、そして例えばヒトγ-1C領域である。

キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインナービトロ又はインナービボで培養



してキメラ抗体を製造する。

あるいは、マウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNA並びにマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

本発明はさらに、

(A) (1) ヒトL鎖C領域、及び

(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び

(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。

好ましい態様においては、前記L鎖CDRは配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列の範囲が表9において定義されるアミノ酸配列を有し、前記H鎖CDRは配列番号25, 27, 29及び31に示されるアミノ酸配列であって該アミノ酸配列の範囲が表9において定義されるアミノ酸配列を有し；前記ヒトL鎖FRがREIに由来するものであり；前記ヒトH鎖

F RはN E W又はH G S Iコンセンサス配列又はH A Xに由来するものであり；前記ヒトL鎖C領域はヒト $\kappa$ C領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒト $\gamma$ -1 Cである。

好ましい態様においては、L鎖V領域は表2においてR V<sub>L</sub> aとして示されるアミノ酸配列を有し、H鎖V領域は表3にR V<sub>H</sub> a、R V<sub>H</sub> b、R V<sub>H</sub> c、R V<sub>H</sub> d、R V<sub>H</sub> e又はR V<sub>H</sub> fとして示されるアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列R V<sub>H</sub> fが最も好ましい。

再構成抗体の製造のためには、2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒトL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒトH鎖をコードするDNAを含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そしてこの形質転換された細胞をインービボ又はインービトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる。

あるいは、再構成ヒトL鎖をコードするDNA及び再構成ヒトH鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をインービボ又はインービトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。

こうして生産されたキメラ抗体又は再構成ヒト抗体は、常法に従って、例えばプロテインAアフィニティークロマトグ

ラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により単離、精製することができる。

本発明のキメラL鎖又は再構成ヒトL鎖はH鎖と組み合わせることにより完全な抗体を作製するために使用することができる。同様に本発明のキメラH鎖又は再構成ヒトH鎖はL鎖と組み合わせることにより完全な抗体を作製するために用いることができる。

本発明のマウスL鎖V領域、再構成ヒトL鎖V領域、マウスH鎖V領域、及び再構成ヒトH鎖V領域は、本来、抗原であるヒトIL-6Rと結合する領域であり、それ自体として、又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

また、本発明のL鎖V領域CDR及びH鎖V領域CDRも、本来、抗原であるヒトIL-6Rと結合する部分であり、それ自体として又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

本発明のマウスL鎖V領域をコードするDNAはキメラL鎖をコードするDNA又は再構成ヒトL鎖をコードするDNAの作製のために有用である。同様にマウスH鎖V領域をコードするDNAはキメラH鎖をコードするDNA又は再構成ヒトH鎖をコードするDNAの作製のために有用である。

また、本発明のL鎖V領域CDRをコードするDNAは再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA及び再構成ヒトL鎖をコードするDNAの作製のために有用である。同様に本発明のH鎖V領域CDRをコードするDNAは再構成ヒトH鎖

V領域をコードするDNA及び再構成ヒトH鎖をコードするDNA作製のために有用である。

### 実 施 例

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

#### 実施例 1. ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローン化

ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローン化した。

##### 1. 全 RNA の調製

ハイブリドーマ AUK 12-20 からの全 RNA を、Chirgwin ら、Biochemistry, 18, 5294 (1979) により記載されている方法に従って調製した。すなわち、 $2 \times 10^8$  個のハイブリドーマ AUK 12-20 の細胞を 20 ml の 4 M グアニジンチオシアネート (Fulka) 中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の 5.3 M 塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれを Beckman SW 40 ローター中で 31,000 rpm にて 20℃ で 24 時間遠心分離することにより RNA を沈澱させた。RNA 沈澱物を 80% エタノールにより洗浄し、そして 1 mM EDTA 及び 0.5% SDS を含有する 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150  $\mu$ l 中に溶解し、そしてそれに Proteinase (Boehringer) を 0.5 mg/ml となるように添加した後、37℃ にて 20 分

間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてRNAをエタノールで沈澱させた。次に、RNA沈澱物を1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH 7.5) 200  $\mu$ lに溶解した。

## 2. 一本鎖cDNAの合成

J. W. Larrickら、Biotechnology, 7, 934 (1989)により記載されている方法に従って一本鎖cDNAを合成するため、前記のようにして調製した全RNAの約5  $\mu$ gを40mM KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mMジチオスレイトール、0.5mM dATP, 0.5mM dGTP, 0.5mM dCTP, 0.5mM dTTP, 35  $\mu$ M oligo dTプライマー (Amersham), 48ユニットのRAV-2逆転写酵素 (RAV-2: Rous associated virus 2; Amersham) 及び25ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤 (Amersham) を含有する50mM Tris-HCl (pH 8.3) 緩衝液10  $\mu$ lに溶解し、そしてこの反応混合物を37℃にて60分間インキュベートしそして次のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法のために直接使用した。

## 3. 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler Model PHC-2 (Techne) を用いてPCR法を行った。

### (1) マウスL鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

PCR法に使用するプライマーは、配列番号: 1~11に

示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー (マウスカッパ型L鎖リーダー配列とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号: 12に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (マウスカッパ型L鎖C領域とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991) であった。

まず、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dCTP, 0.1mM dTTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5ユニットのDNAポリメラーゼAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus), 0.25μMのそれぞれのMKVプライマー、3μMのMKCプライマー及び一本鎖cDNA合成の反応混合物1μlを含有するPCR溶液100μlを94℃の初期温度にて1.5分間そして次に94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

## (2) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号: 13~22に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1~10 (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号:

23に示すMHC (Mouse Heavy Constant) プライマー (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。前記3.(1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により増幅を行った。

#### 4. PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片をQIAGEN PCR生成物精製キット (QIAGEN Inc. US) を用いて精製し、そして10mM MgCl<sub>2</sub> 及び150mM NaClを含有する100mM Tris-HCl (pH7.6) 中で10ユニットの制限酵素SalI (GIBCO BRL) を用いて37℃にて3時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてDNAをエタノール沈澱により回収した。次に、DNA沈澱物を10ユニットの制限酵素XmaI (New England Biolabs) により37℃にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、低融点アガロース (FMC Bio. Products, 米国) を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。

約450bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65℃にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び200mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを

含有する 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した。こうして、マウスカッパ型 L 鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成る DNA 断片、及びマウス H 鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成る DNA 断片を得た。上記 DNA 断片はいずれもその 5' - 末端に Sal I 接着末端を有しそしてその 3' - 末端に Xma I 接着末端を有する。

#### 5. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含んで成る Sal I-Xma I DNA 断片約 0.3  $\mu$ g を、プラスミド pUC19 を Sal I 及び Xma I で消化することにより調製した pUC19 ベクター約 0.1  $\mu$ g と、50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ジチオスレイトール、1 mM スペルミジン、1 mM ATP, 0.1  $\mu$ g/ml のウシ血清アルブミン及び 2 ユニット T4 DNA リガーゼ (New England Biolabs) を含有する反応混合物中で、16 °C にて 16 時間反応させ連結した。

次に、7  $\mu$ l の上記連結混合物を大腸菌 DH5 $\alpha$  のコンピテント細胞 200  $\mu$ l に加え、そしてこの細胞を氷上で 30 分間、42 °C にて 1 分間そして再び氷上で 1 分間静置した。次いで 800  $\mu$ l の SOC 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を加え、37 °C にて 1 時間インキュベートした後、2 $\times$ YT 寒天培地



(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を、50  $\mu$ g/mlのアンプシリンを含有する2×YT培地5ml中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、アルカリ法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従ってプラスミドDNAを調製した。

こうして得られた、ハイブリドーマAUK12-20に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをp12-k2と命名した。

上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマAUK12-20に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをSalI-XmaI DNA断片から作成し、そしてp12-h2と命名した。

#### 実施例2. マウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化

実施例1に記載したのと実質上同じ方法をハイブリドーマPM1, AUK64-7及びAUK146-15に適用して下記のプラスミドを得た:

ハイブリドーマPM1由来のカッパ型L鎖V領域をコード

する遺伝子を含有するプラスミド p P M - k 3 ;

ハイブリドーマ P M 1 由来の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミド p P M - h 1 ;

ハイブリドーマ A U K 6 4 - 7 由来のカッパ型 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミド p 6 4 - k 4 ;

ハイブリドーマ A U K 6 4 - 7 由来の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミド p 6 4 - h 2 ;

ハイブリドーマ A U K 1 4 6 - 1 5 由来のカッパ型 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミド p 1 4 6 - k 3 ; 及び

ハイブリドーマ A U K 1 4 6 - 1 5 由来の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミド P 1 4 6 - h 1 。

なお、上記プラスミドを含有する大腸菌株は、N a t i o n a l C o l l e c t i o n s o f I n d u s t r i a l a n d M a r i n e B a c t e r i a L i m i t e d に、ブダペスト条約に基づいて、1991年2月11日に寄託され、そして表8に示す受託番号を有する。

表 8

プラスミド	配列番号：	受託番号
p 1 2 - k 2	2 4	N C I M B 4 0 3 6 7
p 1 2 - h 2	2 5	N C I M B 4 0 3 6 3
p P M - k 3	2 6	N C I M B 4 0 3 6 6
p P M - h 1	2 7	N C I M B 4 0 3 6 2
p 6 4 - k 4	2 8	N C I M B 4 0 3 6 8
p 6 4 - h 2	2 9	N C I M B 4 0 3 6 4
p 1 4 6 - k 3	3 0	N C I M B 4 0 3 6 9
p 1 4 6 - h 1	3 1	N C I M B 4 0 3 6 5

### 実施例 3. DNA の塩基配列の決定

前記のプラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を、Sequenase™ Version 2.0 キット (U. S. Biochemical Corp、米国) を用いて決定した。

まず、前記のようにして得られたプラスミド約 3  $\mu$ g を 0.2 N NaOH により変性し、配列決定用プライマーとアニールさせ、そしてキット添付の処方に従って  $^{35}$ S-dATP により標識した。次に、標識された DNA を、8 M 尿素を含有する 6 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ゲルを 10 % メタノール及び 10 % 酢酸により固定し、乾燥し、そしてオートラジオグラフィーにかけることにより塩基配列を決定した。

各プラスミドの cDNA コード領域の塩基配列を配列番号：

24～31に示す。

#### 実施例4. CDRの決定

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の可変性は極めて高い(Kabat, E.A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。

ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域の上記のアミノ酸配列に基き、そしてKabatらの報告に従ってIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体の各V領域のCDRを表9に示す如く決定した。

表 9

プラスミド	配列番号:	CDR(1)	CDR(2) (アミノ酸番号)	CDR(3)
p12-k2	24	24-38	54-60	93-101
p12-h2	25	31-35	50-66	99-105
pPM-K3	26	24-34	50-56	89-97
pPM-h1	27	31-36	51-66	99-108
p64-k4	28	24-38	54-60	93-101
p64-h2	29	31-35	50-66	99-109
p146-k3	30	24-34	50-56	89-97
p146-h1	31	31-35	50-66	99-106

### 実施例 5. クローン化された cDNA の発現の確認 (1)

#### 発現プラスミドの作製

PCR法によりクローン化された AUK 12-20 抗体の  $\kappa$  L 鎖及び H 鎖の V 領域をコードする cDNA からキメラ L 鎖/H 鎖をコードする DNA を作製した。マウス AUK 12-20 の V 領域をコードする cDNA を、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) のエンハンサー及びプロモーターを含有する哺乳類細胞発現ベクター (HCMV 発現ベクターと称する) (図 1. 実施例 8) 中でヒト C 領域をコードする DNA に容易に連結するためには、AUK 12-20 抗体の V 領域をコードするマウス cDNA 配列の 5' - 末端及び 3' - 末端に便利な制限酵素切断部位を導入することが必要であった。

5' - 末端及び 3' - 末端へのこれらの修飾は PCR 法を用いて行った。2 セットの PCR プライマーを設計しそして合成した。マウス L 鎖 V 領域及び H 鎖 V 領域の両方について、リーダー配列の始めをコードする DNA にハイブリダイズし、効率的な翻訳のために必須の DNA 配列 (Kozak, M., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) を維持しそして HCMV 発現ベクターへのクローニングのための Hind III 部位を形成するために、L 鎖 V 領域後方プライマー (配列番号: 32)、及び H 鎖 V 領域後方プライマー (配列番号: 33) を調製した。前方 PCR プライマーは、J 領域の末端をコードする DNA にハイブリダイズし、C 領域へのスプライシングのために必須の DNA 配列を維持

しそしてHCMV発現ベクターでのヒトC領域への連結のためのBamHI部位を形成するように、L鎖V領域前方プライマー（配列番号34）、及びH鎖V領域前方プライマー（配列番号35）を調製した。

PCRによる増幅に続き、PCR生成物をHindIII及びBamHIにより消化し、ヒト $\kappa$ 鎖又は $\gamma$ -1鎖C領域DNAを含有するHCMVベクターにクローン化し、そして塩基配列を決定してPCR法による増幅中にエラーが生じなかったことを確認した。得られる発現ベクターをHCMV-12k-g $\kappa$ 及びHCMV-12h-g $\gamma$ 1と称する。

HCMV発現ベクターの構造を図1に示す。プラスミドHCMV-V<sub>L</sub>-HC $\kappa$ において、V<sub>L</sub>領域は任意のマウスL鎖V領域コード配列であることができる。この例において、AUK12-20 $\kappa$ L鎖V領域を挿入することによりHCMV-12k-g $\kappa$ を得た。プラスミドHCMV-V<sub>H</sub>-HC $\gamma$ 1において、V<sub>H</sub>領域は任意のマウスH鎖V領域コード配列であることができる。この例においてはAUK12-20のH鎖V領域を挿入してHCMV-12h-g $\gamma$ 1を得た。

#### COS細胞での一過性 (transient) 発現

キメラAUK12-20抗体のCOS細胞での一過性発現を見るため、前記発現ベクターをCOS細胞において試験した。Gene Pulsar装置 (BioRad) を用いる電気穿孔法 (electroporation) によりDNAをCOS細胞に導入した。すなわち、COS細胞を $1 \times 10^7$  個/mlになるようにphosphate-buffer

ed saline (PBS) に懸濁し、この細胞浮遊液 0.8 ml に DNA (各プラスミドにつき  $10 \mu\text{g}$ ) を加えた。1,900 ボルト (V)、25 マイクロファラッド ( $\mu\text{F}$ ) の電気容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、エクレクトロポレーションした細胞を、10% のウシ胎児血清を含有する DMEM 培地 (GIBCO) 8 ml に加えた。72 時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離して細胞破片を除去し、そして無菌条件下で  $4^{\circ}\text{C}$  にて短時間、又は  $-20^{\circ}\text{C}$  にて長時間貯蔵した。

#### 酵素免疫測定法 (ELISA) によるキメラ抗体の定量

トランスフェクトされた COS 細胞の培養上清を ELISA により測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。キメラ抗体を検出するため、プレートをやぎの抗ヒト IgG (Whole molecule) (Sigma) によりコートした。ブロックした後、COS 細胞からの培養上清を段階希釈しそして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$  鎖特異的、Sigma) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止しそして  $405 \text{ nm}$  における吸光度を測定した。標準として精製ヒト IgG (Sigma) を用いた。

### ヒト I L - 6 R への結合能を確認するための酵素免疫測定 (E L I S A)

トランスフェクトされた C O S 細胞からの培地を E L I S A により測定して、生産されたキメラ抗体が抗原に結合し得るか否かを決定した。抗原への結合の検出のため、プレートを M T 1 8 マウスモノクローナル抗体 (参考例 1) でコートした。1% B S A でブロックした後、可溶性組換えヒト I L - 6 R (S R 3 4 4) を加えた。

洗浄した後、C O S 細胞からの培養上清を段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト I g G を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして 4 0 5 n m における吸光度を測定した。

この結果を図 2 に示した。キメラ抗体 A U K 1 2 - 2 0 をコードする遺伝子の C O S 細胞へのトランスフェクションを実施した。この C O S 細胞の培養上清サンプルは、I L - 6 R に対する強い結合能を示し、図 2 に ○ (オープンサークル) で示す如く、サンプルの希釈度 (抗体の濃度) 依存的に 4 0 5 n m における吸光度が変化し、サンプル中に I L - 6 R レセプターに対する抗体が含まれていることが確認された。

### ヒト I L - 6 R と I L - 6 の結合を阻害する能力の測定

トランスフェクトされた C O S 細胞からの培養上清を測定して培地中に存在する抗体が、I L - 6 R と I L - 6 との結合を阻害するか否かを調べるために、ビオチン化 I L - 6 と



の競合的結合阻害能を調べた。プレートにMT18マウスモノクローナル抗体（参考例1）でコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒトIL-6R（SR344）を加えた。洗浄した後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化IL-6と共に各ウェルに加えた。

洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄の後基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして吸光度を405nmにて測定した。精製マウスAUK12-20モノクローナル抗体を陽性対照として用いた。無関係の抗体を発現するCOS細胞からの培地を陰性対照として用いた。

この結果を図3に示した。キメラ抗体AUK12-20をコードする遺伝子でトランスフェクトしたCOS細胞の培養上清は、最高、及び2番目に高いサンプル濃度でIL-6RとIL-6の結合を阻害した。すなわち、図3に●で示す如く、サンプル希釈度（抗体の濃度）依存的に405nmにおける吸光度が変化し、サンプル中の抗体がIL-6RとIL-6の結合を阻害していることが認められた。これは陽性対照の吸光度の抗体濃度依存的変化（○）にほぼ一致することからも確認出来た。

なお、陰性対照（△）は阻害活性が全く認められなかった。

#### 実施例6. クローン化cDNAの発現の確認（2）（キメラPM-1抗体の作製）

##### 発現ベクターの作製

キメラPM-1抗体を発現するベクターを作製するため、

それぞれマウス PM-1  $\kappa$  L 鎖及び H 鎖 V 領域をコードする cDNA クローン pPM-k3 及び pPM-h1 を PCR 法により変形し、そして HCMV 発現ベクター（図 1 を参照のこと）に導入した。L 鎖 V 領域のための後方プライマー pmk-s（配列番号：38）及び H 鎖 V 領域のための後方プライマー pmh-s（配列番号：40）を、リーダー配列の最初をコードする DNA にハイブリダイズし且つ Kozak コンセンサス配列及び HindIII 制限部位を有するように設計した。L 鎖 V 領域のための前方プライマー pmk-a（配列番号：36）及び H 鎖 V 領域のための前方プライマー pmh-a（配列番号：39）を、J 領域の末端をコードする DNA 配列にハイブリダイズし且つ スプライドナー配列及び BamHI 制限部位を有するように設計した。

$\kappa$  L 鎖 V 領域のため、2 種類の前方プライマーを合成した。ほとんどの  $\kappa$  L 鎖においては、位置 107 のリジンが保存されているが、マウス PM-1  $\kappa$  L 鎖においては位置 107 がアスパラギンである。キメラ PM-1 抗体の抗原結合活性に対するこの変化の効果を検討するため、前方プライマー pmk-b（配列番号：37）を、位置 107 がアスパラギンからリジンに変わるように設計した。PCR 反応に続き、PCR 生成物を精製し、HindIII 及び BamHI で消化し、そして pUC19 ベクター（Yanish-Perron ら、Gene (1985) 33:103-109）にサブクローニングした。DNA 配列決定の後、HindIII - BamHI 断片を切出し、そして H 鎖 V 領域については発現ベクター

HCMV-V<sub>H</sub>-HC $\gamma$ 1にクローン化してHCMV-PMh-g $\gamma$ 1を得、そしてL鎖V領域についてはHCMV-V<sub>L</sub>-HC $\kappa$ にクローン化してHCMV-PMka-g $\kappa$ 及びHCMV-PMkb-g $\kappa$ を得た。

#### COS細胞のトランスフェクション

キメラPM-1抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOST細胞において試験した。HCMV-pmh-g $\gamma$ 1と、HCMV-pmka-g $\kappa$ 又はHCMV-pmkb-g $\kappa$ のいずれかとを、Gene Pulsar装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCOST細胞に同時形質転換した。DNA(プラスミド当り10 $\mu$ g)を、PBS中1 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1,900V, 25 $\mu$ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の $\gamma$ -グロブリン不含有ウシ胎児血清を含有するDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(GIBCO)に加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4℃にて短期間貯蔵し、又は-20℃にて長期間貯蔵した。

#### キメラPM-1抗体の発現及び分析

3日間の一過性発現の後、COST細胞からの培地を集め、そしてキメラPM-1抗体について試験した。培地をまずELISAにより分析して、トランスフェクトされたCOST細胞

胞によりヒト様抗体が生産されたか否かを決定した。このアッセイにおいて標準として既知量の精製ヒトIgGを用いることにより、COS細胞からの培地中に存在するヒト様抗体（この場合、キメラPM-1抗体）の量を推定することが可能である。ヒト抗体の検出のため、プレートをヤギ抗-ヒトIgG（全体分子、Sigma）によりコートした。ブロッキングの後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスフェターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG（ $\gamma$ 鎖特異的、Sigma）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmでの吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG（Sigma）を加えた。

キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの培地はヒト様抗体の発現について陽性であり、そしておよその量が上記のようにして測定された。

次に、キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの同じ培地をヒトIL-6Rに結合する能力について測定した。抗原への結合の測定のため、プレートを、ヒトIL-6Rに対する抗体であるMT18マウスモノクローナル抗体（参考例1）によりコートした。ブロッキングの後、可溶性ヒトIL-6R（SR344）を加えた。洗浄した後、サンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション

及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒト IgG (γ鎖特異的; Sigma) を添加した。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして 405 nm での吸光度を測定した。この測定のために標準品は存在しなかった。

2 個のサンプルの内の 1 つは、マウス PM-1 抗体中に見られる V 領域と同一の V 領域を有するキメラ抗体 (キメラ PM-1 a 抗体、図 4) をコードする遺伝子によるトランスフェクトからのサンプルであった。他の 1 つのサンプルは L 鎖 V 領域中の位置 107 に前記のような 1 個のアミノ酸変化を有するキメラ抗体 (キメラ PM-1 b 抗体、図 4) をコードする遺伝子によるトランスフェクションからのものであった。いずれのサンプルも、サンプルの希釈により減少する IL-6 R に対する強い結合を示した。すなわち、作製されたキメラ PM-1 抗体は機能的であり、そしてその抗原によく結合することができる。最も重要なことは、機能的キメラ PM-1 抗体の証明は、正しいマウス PM-1 V 領域がクローン化されそして配列決定されたことの直接の証拠である。L 鎖 V 領域中の位置 107 にいずれのアミノ酸を有するキメラ抗体も抗原 IL-6 R によく結合した。マウス PM-1 抗体の L 鎖 V 領域中の位置 107 は抗原結合のためにあまり重要ではなく、そしてこの位置におけるアスパラギン及びリジンのいずれも満足に機能するようである。マウス PM-1 抗体はその L 鎖 V 領域のこの位置にアスパラギンを有するので、キメラ PM-1 抗体を用いるその後のすべての研究は、マウス P

M-1 抗体に見出されるそれと同じバージョン a を用いて行った。

より多量の PM-1 抗体を安定に生産するために、dhfr 遺伝子を含有する新たな HCMV 発現ベクターを作製した。キメラ PM-1 抗体のより高い発現レベルを達成するための第一段階は、ベクター HCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>γ</sub>1 (図 1) を変形して、このベクターが欠陥のある (crippled) SV40 プロモーターエンハンサーにより発現される dhfr 遺伝子を含有するようにすることであった。SV40 エンハンサー要素を pSV2-dhfr ベクター (S. Subramani ら、Mol. Cell. Biol. (1981) 1: 854-864) から除去し、そして SV40 プロモーターによって発現される neo 遺伝子の代りに「欠陥のある」SV40 プロモーターにより発現される dhfr 遺伝子を HCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>γ</sub>1 に挿入した。次に、この新しい HCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>γ</sub>1-dhfr ベクターにマウス PM-1 V 領域を挿入した。この改良された発現ベクターの作製を実施例 10 に詳細に記載する。

CHO dhfr (-) 細胞 (G. Vrlaub ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77: 4216-4220) を 2 種類のプラスミド DNA すなわちキメラ PM-1 α L 鎖を発現するための HCMV-V<sub>L</sub>-HC<sub>κ</sub> ベクター (HCMV-PM<sub>κ</sub>a-g<sub>κ</sub>) 及びキメラ PM-1 H 鎖を発現するための HCMV-V<sub>H</sub>-HC<sub>γ</sub>1-dhfr ベクター (DHFR-ΔE-PM<sub>H</sub>-g<sub>γ</sub>1; 実

施例10)により同時形質転換した。DNA(各プラスミドにつき $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )をPBS中 $1\times 10^7$ 細胞/ $\text{ml}$ の0.8mlのアリコートに加えた。1900Vの電圧 $25\mu\text{F}$ の電気容量でパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、ヌクレオシド及び10% FCSを含有するAlpha Minimal Essential Medium培地( $\alpha$ -MEM)10mlに加えた。一夜のインキュベーションの後、培地を、ヌクレオシドを含有せず10% FCS及び $500\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418(GIBCO)を含有する $\alpha$ -MEMに変えて、dhr<sup>+</sup>及びneo<sup>+</sup>形質転換細胞の選択を行った。選択の後、選択されたクローンを用いて遺伝子増幅を行った。 $2\times 10^{-8}$ Mメソトレキセート(MTX)中での1ラウンドの増幅の後、約 $3.9\mu\text{g}/10^6$ 細胞/日のキメラPM-1aの抗体を生産する細胞系(PM1k3-7)を選択した。

ヒトIL-6RへのIL-6の結合を阻害するキメラ抗体の能力についてのELISA測定

トランスフェクトされたCOS細胞において又は安定なCHO細胞系において生産された抗体を測定して、それらが、IL-6Rへのビオチン化IL-6の結合と競争するか否かを決定した。プレートをマウス抗体MT18によりコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)を加えた。洗浄の後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化IL-6と一緒に各ウェルに加えた。洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ストレプト

アビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止させ、そして405nmにおける吸光度を測定した。結果を図5に示す。

#### 実施例7. 再構成ヒトPM-1抗体の作製

より迅速に且つより効率的にCDR移植を達成するため、PCRによる逐次CDR移植法を開発した。この方法はPCR変異誘発法(Kammannら、Nucleic Acid Res. 17:5404, 1989)に基く。

CDR移植のための選択されたヒトFRをコードするDNAを含有する鋳型DNAを調製するために、適当な再構成ヒトV領域をコードするDNAを便利なベクターに再クローニングする必要があった。プラスミドa1ys11及びF10のDNAはそれぞれ再構成ヒトD1.3のL鎖及びH鎖をコードしており、ヒトREIからのFRをコードするDNA及びNEWからのFRをコードするDNAをそれぞれ含有する。再構成ヒトD1.3のL鎖V領域をコードするDNA配列を含有する約500bpのNcoI-BamHI断片をa1ys11から切り出し、そしてHindIII及びBamHIで開裂されたpBR327にサブクローニングしてプラスミドV1-lys-pBR327を得た。このV1-lys-pBR327からのHindIII-BamHI断片を、HindIII及びBamHIにより開裂されたpUC19に挿入してプラスミドV1-lys-pUC19を得た。

再構成ヒトD1.3のH鎖V領域をコードするDNA配列



を含有する約700bpのNcoI-BamHI断片をF10から切り出し、そしてHindIII-NcoIアダプターを用いてpBR327のHindIII-BamHI部位にサブクローニングし、Vh-lys-pBR327を得た。次に、このプラスミドからHindIII-BamHI断片を切り出し、そしてHindIII及びBamHIにより開裂されたpUC19にサブクローニングしてVh-lys-pUC19を得た。

なお、プラスミドaly11及び再構成ヒトD1.3のL鎖V領域FRをコードするDNA配列はヒト型化CAMPATH-1H抗体(Nature 332:323-327(1988))のそれと同じである。鋳型として使用した、プラスミドF10中の再構成ヒトD1.3のH鎖V領域をコードするDNA配列は、V. Verhoeyら、Science 237:1534-1536(1988)のFig. 2に記載されている。

図6は、再構成ヒトPM-1のH鎖V領域の第一バージョンをコードするDNAの作製のために使用されたプライマー及びPCR反応を模式的に示す。後方プライマーA(APCR1; 配列番号: 41)及び前方プライマーE(APCR4; 配列番号: 42)は、このベクター上のDNA配列にハイブリダイズする。APCR1及びAPCR4はpUC19ベクターのために特に設計されたが、ユニバーサルM13配列プライマーを使用することもできる。

CDR1移植/変異誘発プライマーB(phv-1; 配列

番号：43）、CDR2移植プライマーC（phv-2；配列番号：44）、及びCDR3移植プライマーD（phv-3；配列番号：45）は40～60bpの長さを有し、マウスPM-1のH鎖V領域のCDRをコードするDNA及び該CDRをコードするDNAを挟む鋳型DNA中のヒトFRをコードするDNA配列から成る。第一のPCR反応において前方プライマーAPCR4及び後方プライマーDを用いた。マウスPM-1のCDR3配列をコードするDNAを含有する第一PCR生成物を精製し、そして第二PCR反応において後方プライマーとしてのプライマーCと共に前方プライマーとして使用した。同様にして、マウスPM-1のCDR2及びCDR3をコードするDNAを含有する第二PCR生成物、並びにマウスPM-1の3個すべてのCDRをコードするDNAを含有する第三PCR生成物をそれぞれ次のPCR段階のプライマーとして使用した。完全な再構成ヒトPM-1 H鎖V領域をコードするDNAを有する第四PCR生成物を精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてさらに分析するためにpUC19にサブクロニングした。

再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAの作製のために3種類の変異誘発プライマーphv-1、phv-2及びphv-3を合成した。これらは8M尿素を含有する12%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。変異誘発プライマーphv-1は、マウスPM-1抗体のCDR1の移植のためのみならずヒトFR1中の位置27及び30におけるそれぞれのSerからTyrへ、及びSerからThr

への変異のために設計された。各  $100\ \mu\text{l}$  の PCR 反応物は典型的には  $10\ \text{mM}$  Tris-HCl (pH 8.3),  $50\ \text{mM}$  KCl,  $1.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $250\ \mu\text{M}$  dNTP,  $50\ \text{ng}$  の鋳型 DNA (Vh-lys-pUC19),  $2.5\ \text{u}$  の AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus)、及びプライマーを含有した。 $1\ \mu\text{M}$  ずつの phv-3 プライマー及び APCR4 プライマーを含む第一の PCR 反応を行い、 $94^\circ\text{C}$  にて  $1.5$  分間の最初の変性の後、 $94^\circ\text{C}$  にて  $1$  分間、 $37^\circ\text{C}$  にて  $1$  分間及び  $72^\circ\text{C}$  にて  $1$  分間の  $30$  サイクルを反復した。アニーリング段階と合成段階の間の変温時間は  $2.5$  分間であった。最終サイクルの完了の後、 $72^\circ\text{C}$  にて  $10$  分間の最終伸長反応を行った。 $523\ \text{bp}$  の PCR 生成物を  $1.6\%$  低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして次に第二の PCR 反応におけるプライマーとして使用した。

第二の PCR 反応において約  $1\ \mu\text{g}$  の精製された第一 PCR 生成物及び  $25\ \text{pmole}$  の変異誘発プライマー phv-2 をプライマーとして使用した。PCR 条件は第一の PCR 反応について記載したのと同じであった。同様にして、第二の PCR 反応からの  $665\ \text{bp}$  の PCR 生成物をプライマー phv-1 と共に第三の PCR 反応において使用し、そして第三の PCR 反応からの  $737\ \text{bp}$  の PCR 生成物をプライマー APCR1 と共に第四の PCR 反応において使用した。第四の PCR 反応からの  $1.172\ \text{kb}$  の PCR 生成物を精製し、HindIII 及び BamHI で消化し、そして次に再構成と

トPM-1抗体H鎖V領域を含有する約700bpの断片をpUC19ベクターにサブクローニングした。配列決定した4個のクローンの内2個が正しいアミノ酸配列をコードするDNA配列を有しており、そしてpUC-RVh-PM1aと命名した。

再構成PM-1抗体H鎖V領域の他のバージョンをコードするDNAを作製するため5種類の変異誘発PCRプライマーを合成した。各PCR反応は前記の反応条件と本質的に同じ条件下で行われた。バージョン「b」のため、変異誘発プライマーphv-m4 (Val-71→Arg-71) (番号はKabatらによる; 表4参照) (配列番号: 46) 及びAPCR4を、鑄型DNAとしてのpUC-RVh-PM1aと共に第一PCR反応において使用した。この第1PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてプライマーAPCR1と共に第二PCR反応における前方プライマーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を1.6%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてpUC19にてサブクローニングしてpUC-RVh-PM1bを得た。同様にして、変異誘発プライマーphv-nm (Asp-1→Gln-1)

(配列番号: 47) 及び鑄型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「c」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1c) を得、変異誘発プライマーphv-m6 (Ile-48→Met-48) (配列番号: 48) 及び鑄型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「d」をコードす

るDNA (pUC-RVh-PM1d) を得、変異誘発プライマー p h v - n m 及び鋳型 pUC-RVh-PM1c を用いてバージョン「e」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1e) を得、そして変異誘発プライマー p h v - m 7 (T h r - 2 8 → S e r - 2 8、及び P h e - 2 9 → I l e - 2 9) (配列番号: 49) 及び鋳型 pUC-RVh-PM1b を用いてバージョン「f」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1f) を得た。再構成H鎖V領域バージョン「f」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号54に示す。

図7は、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョンをコードするDNAの作製において使用したプライマー及びPCR反応を模式的に示す。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョンをコードするDNAの作製のため、CDR1移植プライマー p k v - 1 (配列番号: 50)、CDR2移植プライマー p k v - 2 (配列番号: 51) 及びCDR3移植プライマー p k v - 3 (配列番号: 52) を合成し、そして8M尿素を含有する12%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。前記のようにしてPCR反応を行った。第一PCR反応物は1  $\mu$ M ずつの p k v - 3 プライマー及びA PCR 4 プライマーを含有した。第一PCR反応からの350bpのPCR生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして第二PCR反応における前方プライマーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を精製し、B a m H I 及び H i n d I I I で消化し、そしてCDR3が移

植されたDNAを含有する500bp断片をDNA配列決定のためにpUC19ベクターにサブクロニングした。正しい配列を有するプラスミドDNAを同定し、そして次のPCR反応における鋳型DNAとして使用した。第三PCR反応において25pmoleの変異誘発プライマーpkv-2及びAPCR4を使用した。第三PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてプライマーpkv-1と共に第四PCR反応におけるプライマーとして使用した。同様にして、第四PCR反応からのPCR生成物をAPCR1プライマーと共に第五PCR反応におけるプライマーとして使用した。

第五PCR反応からの972bpのPCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そしてDNA配列決定のためにpUC19にサブクロニングした。CDR2領域において問題点が認識され、さらに2回のPCR反応が必要であった。第六PCR反応及び第七PCR反応において、pUC19ベクターにクロニングされた第五PCR反応からのPCR生成物を鋳型DNAとして使用した。第六PCR反応においてプライマーはpkv-2及びAPCR4であった。第六PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてAPCR1プライマーと共に第七PCR反応におけるプライマーとして使用した。第七PCR反応からのPCR精製物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そして500bp DNA断片をDNA配列決定のためにpUC19にサブクロニングした。配列決定した5個のクローンの内2個のクローンが正しいDNA配列を有していた。このク

ローンを pUC-RV1-PM1a と称する。この配列を配列番号：55 に示す。

再構成ヒト PM-1 L鎖 V領域の他のバージョンをコードする DNA の作製のため、変異誘発プライマー p v k - m 1 (配列番号：53) を合成した。PCR 反応は本質的に前記の通りであった。第一 PCR 反応において、変異誘発プライマー p k v - m 1 (P h e - 71 → T y r - 71) 及び APCR4 プライマーを鋳型 DNA としての pUC-RV1-PM1a と共に使用した。第一 PCR 反応からの PCR 生成物を精製し、そして APCR1 プライマーと共に第二 PCR 反応におけるプライマーとして使用した。第二 PCR 反応からの PCR 生成物を精製し、BamHI 及び HindIII により消化し、そして DNA 配列決定のために pUC19 にサブクローニングした。このクローンを pUC-RV1-PM1b と命名した。

実施例 8. 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で、発現させるためのヒトサイトメガロウイルス前期 (HCMV) プロモーターを用いるベクターの作製 (図 1)

キメラ PM-1 抗体の L鎖 V領域をコードする DNA 断片及びキメラ PM-1 抗体の H鎖 V領域をコードする DNA 断片を、それぞれ、哺乳類細胞中でヒト  $\kappa$  L鎖又はヒト  $\gamma$ -1 H鎖を発現するように設計された HCMV 発現ベクター (図 1 を参照のこと) HCMV-V<sub>L</sub>-KC $\kappa$  及び HCMV-V<sub>H</sub>-HC $\gamma$ 1 にまず挿入した。該 HCMV 発現ベクターの作製のための詳細な記載は、Maeda ら、Human Antibodies and Hybridomas (1991) に示されている。

2 : 1 2 4 - 1 3 4 ; C . A . K e t t l e b o r o u g h  
ら、P r o t e i n E n g e n e e r i n g ( 1 9 9 1 )  
4 : 7 7 3 - 7 8 3 に公表されている。両ベクターは p S V  
2 n e o ( P . J . S o u t h e r n e t a l . , J . M  
o l . A p p l . G e n e t . ( 1 9 8 2 ) 1 : 3 2 7 - 3  
4 1 ) に基礎を置き、そして免疫グロブリン L 鎖又は H 鎖の  
高レベルの転写のためにヒトサイトメガロウイルス ( H C M  
V ) プロモーター及びエンハンサー ( M . B o s h a r t ら、  
C e l l ( 1 9 8 5 ) 4 1 : 5 2 1 - 5 3 0 ) を含有する。

L 鎖発現ベクターはヒト  $\kappa$  C 領域 ( T . H . R a b b i t  
t s ら、C a r r . T O P . M i c r o b i o l . I m m u  
n o l . ( 1 9 8 4 ) 1 1 4 : 1 6 6 - 1 7 1 ) をコードす  
るゲノム DNA を含有し、そして H 鎖発現ベクターはヒト  $\gamma$   
- 1 C 領域 ( N . T a k a h a s h i ら、C e l l ( 1 9 8  
2 ) 2 9 : 6 7 1 - 6 7 9 ) をコードするゲノム DNA を含  
有する。これらの H C M V 発現ベクターは多能であり、そし  
て種々の哺乳類細胞タイプにおける一過性 ( t r a n s i e  
n t ) 発現及び安定な発現のために使用することができる。

実施例 9 . 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で発現さ  
せるためのヒトエロンゲーションファクター  $1\alpha$  ( H E F -  
 $1\alpha$  ) プロモーターを使用するベクターの作製 ( 図 8 及び図  
9 )

ヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファ  
クター  $1\alpha$  ( H E F -  $1\alpha$  ) は最も豊富な蛋白質の 1 つであ  
る。これはほとんどの細胞で発現される。ヒト E F -  $1\alpha$  プ  
ロモーター-エンハンサーの転写活性は S V 4 0 前期プロモ



ーター－エンハンサーのそれに比べて約100倍である (D. W. Kimら、Gene (1990) 91: 217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264: 5791-5798)。2. 5kbのHEF-1 $\alpha$ プロモーター－エンハンサー領域は、該遺伝子の5'-末端に接する約1.5kbのDNA、第一エクソン中の33bp、第一イントロン中の943bp、及び第二エクソンの最初の部分の10bpから成る。この後2.5kbのHindIII - EcoRI断片をプラスミドpEF321-CAT (D. W. Kimら、Gene (1990) 91: 217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264: 5791-5798) から切り出し、そしてpdkCRベクター (M. Tsuchiyaら、Embo J. (1987) 6: 611-616)、K. O'Haraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 3, 1527-1531, (1981)、(R. Fukunagaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81, 5086-5090 (1984)) にクローニングして、SV40前期プロモーター－エンハンサーを含有する約300bpのHindIII - EcoRI断片を置き換えてpTEF-1を得た。

pTEF-1をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIII リンカーに連結した。次に、この修飾されたpTEF-1ベクターDNAから約1.6kbのHindIII - SmaI断片を切り出した。

HCMV-12h-gr1をEcoRIにより部分消化し、Klenowポリメラーゼによりフィラーインし、そして自己連結することにより、実施例5において作製したHCMV-12h-gr1からプラスミドHCMV-12h-gr1(ΔE2)を作製した。

プラスミドHCMV-12h-gr1(ΔE2)をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィラーインし、そしてHindIIIで消化した。ヒトγ-1C領域をコードするDNA配列を含有する約7kbの断片を、HEF-1αプロモーター-エンハンサーを含有する前記の1.6kb HindIII-SmaI断片に連結してHEF-12h-gr1を得た。このベクター中のHEF-1αプロモーター・エンハンサー領域は、5'-領域に接する380bpのDNAを除き、pTEF-1中のそれと同一であった。HindIII-BamHI断片として存在するこのH鎖V領域は、他のH鎖V領域と容易に交換することができる。

再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNAを含有するHindIII-BamHIDNA断片をpUC-RVh-PM1a, pUC-RVh-PM1b, pUC-RVh-PM1c, pUC-RVh-PM1d, pUC-RVh-PM1e及びpUC-RVh-PM1f(実施例7)から切り出し、そして前記のプラスミドHEF-12h-gr1のHindIII-BamHI部位に挿入して、それぞれ発現ベクターRVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e、及びRVh-PM1fを得

た。発現ベクターRVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1e、及びRVh-PM1f、並びにHEF-PMh-gr1は、それぞれ再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域バージョン「a」, 「b」, 「c」, 「d」, 「e」及び「f」、並びにマウスPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAを有する。

L鎖発現ベクターHEF-12k-gkを作製するため、HEF-1 $\alpha$ プロモーター-エンハンサー領域を含有する約3.0kbのPvuI-HindIII断片をHEF-12h-gr1ら切り出し、そして実施例5において作製したHCMV-L鎖発現ベクターHCMV-12k-gkからの約7.7kbのPvuI-HindIII断片に連結してHEF-12k-gkを得た。H鎖発現ベクターHEF-12h-gr1の場合と同様に、HindIII-BamHI断片として存在するHEF-12k-gk中のL鎖V領域をコードするDNAは他のL鎖V領域をコードするDNAと容易に交換することができる。なお、プラスミドHEF-PMh-gr1は、HEF-12h-gr1(図8)のEF1 $\alpha$ プロモーター領域(PvuI-HindIII断片)によりHCMV-pmh-gr1のHCHVプロモーター領域(PvuI-HindIII断片)を置き換えることにより作製したものである。

再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNAを含有するHindIII-BamHI DNA断片をpUC-RV1-PM1a及びpUC-RV1-PM1b(実施例7)から切り出し、そしてHEF-12k-gkのHindIII-BamHI部

位に挿入し、それぞれ発現ベクターRV1-PM1a及びRV1-PM1bを得た。発現ベクターRV1-PM1a及びRV1-PM1b、並びにHEF-PM<sub>k</sub>-gkはそれぞれ再構成ヒトL鎖V領域「a」及び「b」、並びにマウスPM-1 L鎖V領域をコードするDNAを有する。なお、プラスミドHEF-PM<sub>k</sub>-gkは、HEF-12k-gk (図9)のEF1 $\alpha$ プロモーター領域(PvuI-HindIII断片)によりHCMV-pmk-a-gkのHCMVプロモーター領域(PvuI-HindIII断片)を置き換えることにより作製したものである。

実施例10. 遺伝子操作された抗体をCHO細胞中で高レベルで発現させるための、欠陥SV40プロモーター-エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレクターゼ(dhfr)遺伝子を用いるベクターの作製(図10及び図11)

SV40前期プロモーターからエンハンサー配列を除去するため、プラスミドpSV2-dhfr (S. Subramaniamら、Mol. Cell. Biol. (1981) 1: 854-864) (ATCC 33694)をSphI及びPvuIIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィラーインし、そして自己連結してpSV2-dhfr- $\Delta$ Eを得た(図10)。HCMVプロモーター、H鎖V領域をコードするDNA及びヒト $\gamma$ -1C領域をコードするDNAを含有する約3.7kbのEcoRI断片を、EcoRIによる部分消化によりHCMV-PMh-g $\gamma$ 1ら切り出した。この断片を、EcoRI-消化pSV2-dhfr- $\Delta$ Eに連結してDHFR- $\Delta$ E-PMh-g $\gamma$ 1を得た。

H E F - 1  $\alpha$  プロモーター-エンハンサーを用いる H 鎖発現ベクターに基いて類似のベクターを作製した (図 11 を参照のこと)。H C M V - 1 2 h - g r 1 に由来する約 3.7 kb の E c o R I 断片を、E c o R I - 消化 p S V 2 - d h f r -  $\Delta$  E と連結して D H F R -  $\Delta$  E - 1 2 h - g r 1 を得た。D H F E -  $\Delta$  E - 1 2 h - g r 1 中の d h f r 配列に続く B a m H I 部位を、B a m H I による部分消化、K l e n o w ポリメラーゼによるフィラーイン及び自己連結により除去した。d h f r c D N A を含有する約 4 kb の P v u I - B a m H I 断片をこの修飾された D H F R -  $\Delta$  E - 1 2 h - g r 1 から切り出し、そして実施例 12 において作製した R V h - P M 1 f - 4 からの約 3 kb の P v u I - B a m H I 断片に連結して D H F R -  $\Delta$  E - R V h - P M 1 f を得た。

上記の改良されたプラスミドは本発明の再構成ヒト P M - 1 抗体の製造のために使用することができる。

#### 実施例 11. 再構成ヒト P M - 1 抗体の種々のバージョンの発現及び分析

再構成ヒト P M - 1 抗体の L 鎖及び H 鎖を発現する各 H E F - 1  $\alpha$  ベクターを C O S 細胞に同時形質転換 (c o - t r a n s f e c t) した。標準対照としてキメラ P M - 1 抗体の L 鎖及び H 鎖を発現する各 H E F - 1  $\alpha$  ベクターも C O S 細胞に同時形質転換した。3 日後、形質転換された C O S 細胞からの培地を集め、そして E L I S A により (1) 上清中に存在するヒト I g G 抗体の量について、及び (2) I L - 6 R に結合するその I g G の能力について分析した。次に、

同じサンプルをさらに、ELISAにより、ヒトIL-6RへのヒトIL-6の結合を阻害する該抗体の能力について試験した。

再構成ヒトPM-1抗体L鎖を発現する2種類のベクターの一方(RV1-PM1a又はRV1-PM1b)及びキメラPM-1抗体H鎖を発現するベクター(HCMV-PMh-gr1)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の2種類のバージョンの評価を行った。細胞をまた、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HCMV-PMka-gk及びHCMV-PMh-gr1)により同時形質転換した。未精製のCOS細胞上清を用いるデータは、ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」がキメラPM-1抗体L鎖と同等であることを示した。しかしながら、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「b」はヒトIL-6Rへの結合能を実質的に保持しなかった。これらの結果から、FR3中の位置71のフェニルアラニン(CAMPAHTH-1Hのために修飾されたヒトREI中に存在する)からチロシン(天然ヒトREI及びマウスPM-1抗体中に存在する)への変化は機能的抗原結合部位の形成に対して非常に有害であることが結論された。

再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の種々のバージョンを評価する次の実績において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」を常に用いた。

再構成ヒトPM-1抗体H鎖の発現する6種類のベクターの1つ(RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e又はRVh-PM1f)及び再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」を発現するベクター(RV1-PM1a)によりCOSC細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の6種類のバージョンを評価した。細胞を、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HEF-PMk-gk及びHEF-PMh-gr1)によっても同時形質転換した。未精製のCOSC細胞上清を用いた予備データーが示すところによれば、ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」及び再構成ヒトPM-1抗体H鎖のバージョン「f」は、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖と同等であった。

この予備データーを確認するため、キメラPM-1抗体及び再構成ヒトPM-1抗体をCOSC細胞上清から濃縮そしてプロテインAを用いて精製した。すなわち、COSC細胞からの培地を100kdカットオフ限外濾過装置(Amicon)を用いて濃縮した。濃縮した培地をプロテインAアガロース(Affigel Protein A MAPSIIキット、BioRad)を用いて精製した。要約すれば、濃縮された培地を、5ベッドポリウムの結合緩衝液により平衡化されたプロテインAアガロースカラムに適用した。このカラムを15ベッドポリウムの結合緩衝液で洗浄し、そして次に5ベッドポリウムの溶出緩衝液で溶出を行った。そしてマイクロコ

ンセントレーター (Centricon 10, Amicon) を用いて溶出液を濃縮し、溶出緩衝液を PBS に置換した。

キメラ PM-1 抗体、及び再構成ヒト L 鎖 V 領域のバージョン「a」と再構成ヒト H 鎖 V 領域のバージョン「a」, 「b」, 「c」, 「d」, 「e」又は「f」とから成る再構成ヒト PM-1 抗体の精製されたサンプルの分析を行った。L 鎖の「a」バージョン+H 鎖の「f」バージョンが明らかに最良の再構成ヒト PM-1 抗体であった。このものは、キメラ PM-1 抗体と同様にヒト IL-6 R に結合する (図 13)。これはまた、マウス抗体及びキメラ抗体と同様に、ヒト IL-6 がヒト IL-6 R に結合するのを阻害する (図 14)。

#### 実施例 12. 発現レベルを改良するための再構成ヒト PM-1 V 領域の修正

再構成ヒト PM-1 抗体 L 鎖及び H 鎖の V 領域 (配列番号: 54 及び 55) のリーダー配列をコードする DNA 配列内のイントロンを除去するため、V 領域をコードする cDNA を PCR プライマーを用いて再クローニングした。L 鎖及び H 鎖の発現ベクター RV1-PM1a 及び RVh-PM1f を COS 細胞に同時形質転換した。48 時間後、全 RNA を調製し (Chirgwin ら、Biochemistry (1979) 18: 5294-5299)、そしてマウス抗体 V 領域の PCR クローニングについて記載したようにして一本 cDNA 合成のために 5 µg の全 RNA を用いた。3 種類の



P C R プライマーを設計し、そして合成した。L E V - P 1 (配列番号 : 6 0) 及び H E V - P 1 (配列番号 : 5 8) はスプライドナー配列及び B a m H I 部位を含有し、そしてそれぞれ L 鎖及び H 鎖の V 領域のための前方プライマーとして使用した。

H E V - P 2 (配列番号 : 5 9) は H i n d I I I 部位及び A T G 開始コドンの前の K o z a k コンセンサス配列を含有し、そして L 鎖及び H 鎖の V 領域のための後方プライマーとして使用した。1 0 0  $\mu$  l ずつの P C R 反応物は 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 8) , 1 0 m M K C l , 1 0 m M (N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> , 2 m M M g S O <sub>4</sub> , 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 , 0 . 1  $\mu$  g の B S A , 2 5 0  $\mu$  M d N T P , 2 . 5 u の V e n t D N A ポリメラーゼ (B i o . L a b s , U . K . ) , 5 0 % の一本 c D N A 合成反応物並びに 1 0 0 p m o l e ずつの前方プライマー及び後方プライマーを含有した。各 P C R チューブは 5 0  $\mu$  l の鉱油で覆い、そして 9 4  $^{\circ}$  C にて 1 . 5 分間の最初の変性の後、9 4  $^{\circ}$  C にて 1 分間、5 0  $^{\circ}$  C にて 1 分間及び 7 2  $^{\circ}$  C にて 1 分間のサイクル反応を 3 0 回行い、そして次に 7 2  $^{\circ}$  C にて 1 0 分間インキュベートした。L 鎖 V 領域を含有する 4 0 8 b p の P C R 生成物及び H 鎖 V 領域を含有する 4 4 4 b p の P C R 生成物を、2 . 0 % 低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして B a m H I 及び H i n d I I I により消化し、そして p U C 1 9 ベクターにサブクローニングし、それぞれ p U C - R V 1 - P M 1 a - 3 及び p U C - R V h - P M 1 f - 3 を得た。

再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖のV領域のDNA配列は不適切なスプライドナー部位及びアクセプター部位を含有することが明らかになった（配列番号：54及び55を参照のこと）。L鎖V領域内のこれらの部位は高頻度には使用されない（mRNAの約10%）が、H鎖V領域内のこれらの部位は高頻度で使用される（mRNAの約90%）。この異常なスプライシングが再構成ヒトPM-1抗体の低レベルの発現をもたらした。V領域の異常なスプライシングを回避するため、スプライドナー部位をPCR法により除去した。H鎖V領域について、後方プライマーNEW-SP1（配列番号：61）及び前方プライマーNEW-SP2（配列番号62）を合成した。このプライマーはDNA配列TGG GTG AGAをDNA配列TGG GTT CGCに変える。PCR反応の条件はcDNAのクローニングについて前記した通りであったが、鋳型DNAは50ngのpUC-RVh-PM1f-3であり、そしてプライマーはHEV-P2とNEW-SP2、又はHEF-P1とNEW-SP1のいずれかであった。

2個のPCR反応からのPCR生成物を2%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてPCR連結反応において使用した。0.5 $\mu$ gの第一PCR生成物を含有する98 $\mu$ lのPCR反応物及び5ユニットのVent DNAポリメラーゼを94℃にて2分間、50℃にて2分間及び72℃にて5分間インキュベートし、そして次に100pmoleずつのHEV-P1プライマー及びHEV-P2プライマーを加

えた。PCRチューブを30 $\mu$ lの鉱油で覆い、そして94 $^{\circ}$ Cにて1分間、50 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間の25サイクルのPCRにかけ、そして次に72 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートした。

同様にして、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域中のスプライスドナー領域をPCRプライマーREI-SP1（配列番号：63）及びREI-SP2（配列番号：64）を用いて除去した。該プライマーはDNA配列CAG GTA AGGをDNA配列CAG GAA AGGに変える。両PCR生成物、すなわちL鎖V領域についての408bpのDNA断片及びH鎖V領域についての444bpのDNA断片を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして配列決定のためpUC19にサブクローニングしてpUC-RV1-PM1a-4及びpUC-RVh-RM1f-4を得た。

RVh-PM1fのHindIII-BamHI断片を、pUC-RVh-PM1f-4のHindIII-BamHI領域と置き換えることにより、RVh-PM1f-4を得た。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「a」の配列を配列番号57に示し、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「f」の配列を配列番号56に示す。

実施例13. 再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域をコードするDNAの作製

再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域をコードする

DNAの作製の工程を図16に示す。鑄型となるヒト抗体L鎖V領域をコードする遺伝子は、制限酵素HindIII及びBamHI部位を用いてpUC19ベクターに組み込まれている。8個のPCRプライマー(A~H)を準備し、第1のPCRにより、V領域をコードする遺伝子を4つの領域に分けて増幅させる。プライマーA及びHは、pUC19ベクター上のDNA配列と相補性を持つ。プライマーB、C及びDは、それぞれ移植するCDR領域の遺伝子配列を有する40~60bpのプライマーである。プライマーE、F及びGは、それぞれプライマーB、C及びDの5'側15~20bpのDNA配列と相補性を持つ。4個の第1PCRは、それぞれプライマーAとE、BとF、CとG、及びDとHを用いる。PCR生成物A-EはFR1をコードし、B-FはCDR1とFR2をコードする。A-E断片の3'側とB-F断片の5'側は15~20bpの相補性を持つので、後に、これら断片を連結することが可能となる。同様に、B-F断片は、CDR2及びFR3をコードするC-G断片とも相補性を持つ。そして、C-G断片はさらに、CDR3とFR4をコードするD-H断片とも相補性を持つ。こうしてこれら4種の断片は、互いの相補性により連結が可能となる。PCR反応液中にてこれら4つの断片の連結反応を行った後、プライマーA及びHを加える事により、正しく4つの断片が連結したものが、この第2のPCRによって増幅してくる。こうして得られた第2のPCR生成物は、3つの移植されたCDRを有し、HindIII及びBamHIの消化後、pUC19ベクターに

サブクロニングする。

さらに具体的には、鑄型として再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」をコードするDNAがプラスミドpUC19に挿入されているプラスミドpUC-RV1-PM1a-4を用いた。

前記プライマーA～Hは次の配列を有する。

後方プライマー	配列番号	前方プライマー	配列番号
A. REVERSE	83	E. 1220-L1b	66
B. 1220-L1	65	F. 1220-L2b	68
C. 1220-L2	67	G. 1220-L3b	70
D. 1220-L3	69	H. UNIVERSAL	82

CDR移植用の後方プライマー1220-L1, 1220-L2及び1220-L3については、8M尿素を含む12%ポリアクリルアミドゲルを用いて精製後使用した。

100 $\mu$ lずつのPCR反応物は20mM Tris-HCl (pH8.8), 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.1 $\mu$ gのBSA, 250 $\mu$ M dNTP, 5uのVent DNAポリメラーゼ (BioLabs, U.K.), 50ngのpUC-RV1-PM1a-4 DNA、そして各100pmolesの前方及び後方プライマーを含有した。各PCRチューブは50 $\mu$ lの鉱油で覆い、そして94℃にて1.5分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間の反応を30サイクル行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

252 bp (A-E), 96 bp (B-F), 130 bp (C-G) 及び 123 bp (D-H) の各 PCR 生成物を 2.0% の低融点アガロース (FMC, Bio. Products, USA) ゲルを用いて精製した。すなわち、各 DNA 断片を含有するアガロース片を切り取りそして 65 °C にて 5 分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の 2 mM EDTA 及び 200 mM NaCl を含有する 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そして DNA 断片をエタノール沈澱により回収し、そして 1 mM EDTA を含有する 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、そして PCR 連結反応において使用した。

次に、0.2 µg の各第 1 の PCR 生成物及び 5 ユニットの Vent DNA ポリメラーゼを含有する 98 µl の PCR 反応液を 94 °C にて 2 分間、50 °C にて 2 分間及び 72 °C にて 5 分間インキュベートし、連結反応を行った。そして次に、各 100 pmole の A (REVERSE) 及び H (UNIVERSAL) プライマーを加えて反応液を 100 µl とした後、これを 50 µl の鉱油でおおい、そして 94 °C にて 1 分間、50 °C にて 1 分間及び 72 °C にて 1 分間の反応を 30 サイクル行い、そして次に 72 °C にて 10 分間インキュベートした。

マウスモノクローナル抗体 AUK12-20 の L 鎖の CDR が移植された L 鎖 V 領域をコードする DNA を含有する 558 bp の第 2 PCR の生成物を 2.0% 低融点アガロースゲ

ルを用いて精製し、そしてB a m H I及びH i n d I I Iにより消化後、p U C 1 9ベクターにサブクロニングし、塩基配列を確認し、p U C - R V<sub>L</sub> - 1 2 2 0 aを得た。得られたL鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列表71に示す。

次いで、L鎖発現ベクターを構築するため、再構成ヒト12-20抗体L鎖V領域を含有するH i n d I I I - B a m H I DNA断片を上記プラスミドp U C - R V<sub>L</sub> - 1 2 2 0 aから切り出し、L鎖発現ベクターH E F - 1 2 κ - g κのH i n d I I I - B a m H I部位に挿入し、再構成ヒトA U K 1 2 - 2 0抗体L鎖V領域バージョンaの発現ベクターであるR V<sub>L</sub> - 1 2 2 0 aを得た。

#### 実施例14. 再構成ヒトA U K 1 2 - 2 0抗体L鎖の発現及び分析

##### C O S細胞での一過性 ( t r a n s i e n t ) 発現

再構成ヒトA U K 1 2 - 2 0抗体L鎖を発現するベクターR V<sub>L</sub> - 1 2 2 0 a及びキメラ12-20抗体H鎖を発現するベクター、H E F - 1 2 h - g r 1 (実施例5)によりC O S細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトA U K 1 2 - 2 0抗体L鎖バージョン「a」の評価を行った。すなわち、C O S細胞を $1 \times 10^7$ 個/mlになるようにp h o s p h a t e - b u f f e r e d s a l i n e (P B S)に懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにDNA (各プラスミドについて10 μg)を加えた。Gene Pulsar装置 (B i o R a d)を用い1,900ボルト (V)、25マイ

クロファラッド ( $\mu F$ ) の電気容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エクレクトロポレーションした細胞を、10%のウシ胎児血清 ( $\gamma$ -グロブリン不含) を含有するDMEM培地 (GIBCO) 20 mlに加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離して細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4℃にて短時間、又は-20℃にて長時間貯蔵した。

#### 酵素免疫測定法 (ELISA) によるヒト様抗体の定量

トランスフェクトされたCOS細胞の培養上清をELISAにより測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。ヒト様抗体を検出するため、プレートをやぎの抗ヒトIgG (Whole molecule) (Sigma) によりコートした。ブロックした後、COS細胞からの培養上清を段階希釈しそして各ウェルに加えた。

プレートのインキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG ( $\gamma$ 鎖特異的、Sigma) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。さらにインキュベーションした後、反応を停止しそして405 nmにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG (Sigma) を用いた。

#### ヒトIL-6Rへの結合能を確認するための酵素免疫測定 (ELISA)

トランスフェクトされたCOS細胞からの上清をELISAにより測定して、生産されたヒト様抗体が抗原IL-6Rに結合し得るか否かを決定した。抗原への結合の検出のため、



プレートにMT18マウスモノクローナル抗体（参考例1）でコートした。1% BSAでブロックした後、可溶性組換えヒトIL-6R（SR344）をプレートに加えた。

プレートを洗浄した後、COS細胞からの培養上清を段階希釈し、そして該プレートの各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGをウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmにおける吸光度を測定した。

この結果を図17に示す。再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖バージョン「a」とキメラ12-20抗体H鎖の組み合わせによるヒト様抗体は、キメラ12-20抗体と同様にヒトIL-6Rに対する強い結合能を示し、サンプルの希釈度依存的に405nmにおける吸光度が変化し、サンプル中にIL-6Rに対する抗体が含まれていることが確認された。また、この結果は、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖のバージョン「a」がキメラAUK12-20抗体L鎖と同様に抗原結合能を持つことを示している。

実施例15. ヒトサブグループI（HSGI）コンセンサス配列を用いた再構成ヒト12-20抗体H鎖遺伝子の構築

実施例13で示した方法と同様にして、AUK12-20抗体H鎖V領域のCDRをヒトサブグループIのコンセンサス配列をFRとして有する再構成ヒトV<sub>H</sub>a425（Kettleboroughら、Protein Engineering, 4, 773-783, 1991）に移植した。ま

ず、再構成ヒト  $V_H a 425$  (上記文献中、Fig 3) をコードする  $HindIII - BamHI$  DNA断片をプラスミド  $HCMV - RV_H a - 425 - r 1$  から切り出し、 $pUC19$  ベクターの  $HindIII - BamHI$  部位にサブクローニングし、 $pUC - RV_H - 425 a$  を得た。これを鋳型DNAとして使用した。PCRに用いる8個のプライマー (A1 ~ H1) を合成した。プライマー 1220-H1 は、CDR1の移植及びThr-28からSer-28の変更を誘導する様にデザインし、プライマー 1220-H3 はCDR3の移植及びSer-94からArg-94への変異を誘導する様にデザインした。プライマー 1220-H1, 1220-H2 及び 1220-H3 は、それぞれ8M尿素を含む12%ポリアクリルアミドゲルを用いて精製後、使用した。各プライマーのヌクレオチド配列は次の通りである。

後方プライマー	配列番号	前方プライマー	配列番号
A1. REVERSE	83	E1. 1220-H1b	73
B1. 1220-H1	72	F1. 1220-H2b	75
C1. 1220-H2	74	G1. 1220-H3b	77
D1. 1220-H3	76	H1. UNIVERSAL	82

PCRの条件は、鋳型DNAとして  $pUC - RV_H - 425 a$  を使用し、H鎖CDR移植用プライマーとして上記のものを使用した以外は実施例13に記載したのと同じであった。A1とE1、B1とF1、C1とG1、及びD1とH1のプライマー対を用いて第1PCR反応を行い、それぞれ186 bp (A1-E1), 75 bp (B1-F1), 173 bp (C1

—G1) 及び 105 bp (D1—H1) の各第1 PCR 生成物を 2.0% の低融点アガロースゲルにて精製し、次の第2 PCR 連結反応において使用した。実施例13にて示した条件に従い、各 0.2  $\mu$ g の上記第1 PCR 生成物を用いて第2 PCR (PCR 連結反応を含む) を行い、マウス AUK12—20 抗体の H 鎖 V 領域 CDR が移植されたヒト H 鎖 V 領域を含有する 495 bp の PCR 生成物を得、これを 2.0% 低融点アガロースゲルを用いて精製した。そして BamHI 及び HindIII により消化後、得られた BamHI—HindIII 断片を pUC19 ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認して、pUC—RV<sub>H</sub>—1220a を得た。

ところで、再構成ヒト AUK12—20 抗体 H 鎖 V 領域をコードする DNA 配列を調べた結果、スプライスの供与配列とよく一致する配列が見い出された。この事は、再構成ヒト PM—1 抗体の作成時に問題となった異常なスプライシングを引き起す可能性がある。そこで、この配列を PCR 法により変異させた。変異誘導プライマーとして、SGI—SP1 (配列番号 97) 及び SGI—SP2 (配列番号 98) を合成した。このプライマーは、DNA 配列 AAG GTC AGC を DNA 配列 AAA GTC AGC に変える。PCR 反応の条件は、前記条件と同様に行い、鋳型 DNA は 50 ng の pUC—RV<sub>H</sub>—1220a であり、そしてプライマーは SGI—SP1 と UNIVERSAL (配列番号 82)、または SGI—SP2 と REVERSE (配列番号 83) のいずれかであった。

2 個の P C R 反応からの P C R 生成物を 2 % 低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして P C R 連結反応において使用した。各 0. 2  $\mu$  g の第 1 P C R 生成物及び 5 u の V e n t DNA ポリメラーゼを含有する 9 8  $\mu$  l の P C R 反応液を 9 4  $^{\circ}$ C にて 2 分間、5 0  $^{\circ}$ C にて 2 分間、及び 7 2  $^{\circ}$ C にて 5 分間インキュベートし連結反応を行った。そして次に 1 0 0 p m o l e ずつの U N I V E R S A L 及び R E V E R S E プライマーを加え、5 0  $\mu$  l の鉱油でおおった後、9 4  $^{\circ}$ C にて 1 分間、5 0  $^{\circ}$ C にて 1 分間そして 7 2  $^{\circ}$ C にて 1 分間の第 2 P C R を 3 0 サイクル行い、そして次に 7 2  $^{\circ}$ C にて 1 0 分間インキュベートした。第 2 P C R で得られた 4 9 5 b p の DNA 断片を 2. 0 % 低融点アガロースゲルを用いて精製し、H i n d I I I 及び B a m H I により消化し、これを p U C 1 9 ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を確認して、p U C - R V<sub>H</sub> - 1 2 2 0 a - 2 を得た。

次いで、再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 H 鎖 V 領域をコードする DNA を含有する H i n d I I I - B a m H I DNA 断片を上記 p U C - R V<sub>H</sub> - 1 2 2 0 a - 2 より切り出し、H 鎖発現ベクター H E F - 1 2 h - g r 1 の H i n d I I I - B a m H I 部位に導入し、再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 H 鎖のバージョン a の発現ベクターである R V<sub>H</sub> - 1 2 2 0 a を得た。

再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 H 鎖 V 領域の他のバージョン ( b ~ d ) をコードする DNA を作成するために 2 組の変異誘発 P C R プライマーを合成した。各 P C R 反応は前記

の反応条件と本質的に同じ条件下で行われた。バージョン「b」をコードするDNAの作成のため、2種の第1PCRにおいて、UNIVERSALプライマー（配列番号82）及び変異誘発プライマー1220H-m1a（配列番号78）、あるいは、REVERSEプライマー（配列番号83）と変異誘発プライマー1220H-m1b（配列番号79）の各PCRプライマー、並びに鋳型DNAとしてのpUC-RV<sub>H</sub>-1220aを用いた。それぞれ202bp及び323bpの第1PCR生成物を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製後、前記の反応条件と同様に第2PCR（PCR連結反応を含む）を行い、495bpの生成物（バージョン「b」）を得た。これをHindIII-BamHIにより消化し、そして、pUC19ベクターにサブクローニングし、pUC-RV<sub>H</sub>-1220bを得た。

同様にして、変異誘発プライマー1220H-m2a（配列番号80）、1220H-m2b（配列番号81）及びこの生成物を鋳型pUC-RV<sub>H</sub>-1220aを用いてPCR生成物（バージョン「c」をコードするDNA）を得、HindIII及びBamHIで消化し、pUC19ベクターのHindIII-BamHI部位に挿入してpUC-RV<sub>H</sub>-1220cを得た。さらに、変異誘発プライマー1220H-m1a（配列番号78）、1220H-m1b（配列番号79）及び鋳型としてのpUC-RV<sub>H</sub>-1220cを用いてPCR生成物（バージョンd）を得、これをHindIII及びBamHIで消化してpUC19ベクターのHindIII

—B a m H I 部位に挿入することにより p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 d を得た。

なお、プラスミド p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 b 中にコードされているの再構成ヒト抗体 H 鎖 V 領域バージョン「b」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号 8 4 に示し、p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 d 中にコードされている再構成ヒト H 鎖 V 領域バージョン「d」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列表 8 5 に示す。

次いで、再構成ヒト A U K 1 2 — 2 0 抗体 H 鎖の各バージョンの発現ベクターを構築するために、再構成ヒト A U K 1 2 — 2 0 抗体 H 鎖 V 領域をコードする D N A を含む H i n d I I I — B a m H I 断片を p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 b, p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 c、及び p U C — R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 d より切り出し、H 鎖発現ベクター H E F — 1 2 h — g r 1 の H i n d I I I — B a m H I 部位に挿入して、各バージョンの発現ベクター R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 b, R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 c、及び R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 d をそれぞれ得た。

#### 実施例 1 6 . 再構成ヒト 1 2 — 2 0 抗体の種々のバージョンの発現及び分析

再構成ヒト 1 2 — 2 0 抗体 H 鎖を発現する 4 種類のベクターの 1 つ ( R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 a, R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 b, R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 c、または R V<sub>H</sub> — 1 2 2 0 d ) 及び再構成ヒト A U K 1 2 — 2 0 抗体 L 鎖を発現するベクター R V<sub>L</sub> — 1 2 2 0 a により C O S 細胞を同時形質転換することにより、再

構成ヒト12-20抗体H鎖V領域の4種類のバージョンを評価した。比較のため、COS細胞をキメラ12-20抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター（HEF-12h-gr1及びHEF-12κ-gκ）によっても同時形質転換した。ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖と再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖のバージョン「b」、あるいは再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖と再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖のバージョン「d」との組み合わせによる再構成ヒト12-20抗体は、キメラ12-20抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果を図18及び図19に示す。

実施例17. ヒト抗体HAXを用いた再構成ヒトsle1220H抗体H鎖遺伝子の構築

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域と最も相同性の高いヒト抗体は、タンパクデータベース“Leeds”の検索により、HAXであった（J. Immunology 139, 2496-2501, 1987, SLE患者由来B cell hybridoma 21/28の産生する抗体、遺伝子配列はFig. 4, 5に、アミノ酸配列はFig. 6に記載）。再構成ヒトsle1220H抗体H鎖V領域の設計を、HAX抗体のFR領域とマウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域のCDRを用いて行った。

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域のCDRを含む再構成ヒトsle1220H抗体H鎖V領域

をコードする全DNAは化学合成にて作成した。すなわち、全長439bpのsle1220H抗体H鎖V領域をコードするDNAを各々21bpの重複部位を有する90～94bpの長さの6本のオリゴヌクレオチド(sle1220h1～6；それぞれ、配列番号86～91)に分けて設計した。オリゴヌクレオチドの設計にあたり、2次構造の検索を行ない、構造上に問題のある部位に関して、アミノ酸置換がおきない様に、コドンの第3塩基を変換した。これらのオリゴヌクレオチドの相互関係及び2本鎖合成DNAの完成までの過程を図20に示す。

PCR法を用いて図20に示す反応を行う。すなわち6本の合成オリゴヌクレオチドを同一PCR反応チューブに加え、第1のPCR反応を行う。これにより、2つのオリゴヌクレオチドのアニーリング伸長を行うことができ、さらに、4つのオリゴヌクレオチド、または、全長のオリゴヌクレオチドを得ることができる。次に、末端プライマーA（配列番号92）及びB（配列番号93）を加え、第2のPCR反応を行うことで、正しく全長を有するオリゴヌクレオチドのみを増幅することができる。得られた生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化後、pUC19ベクターにサブクローニングしてシーケンスを行う。

具体的には、100mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dCTP, 0.1mM dTTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> 及び2.5uのDNAポリメラーゼAmpliTaq



(Perkin Elmer Cetus) 並びに各オリゴヌクレオチド 5 pmole を含有する 98  $\mu$ l の反応混合物を 94  $^{\circ}$ C 1.5 分間の変性後、94  $^{\circ}$ C 3 分間、50  $^{\circ}$ C 2 分間、72  $^{\circ}$ C 5 分間の反応を 3 サイクル行い、次に 72  $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベートした。反応液に 50  $\mu$ M の末端プライマー A および B を 1  $\mu$ l ずつ加え、80  $\mu$ l の鉱油で覆い、94  $^{\circ}$ C 1.5 分間の変性後、94  $^{\circ}$ C にて 1 分間、50  $^{\circ}$ C にて 1 分間、72  $^{\circ}$ C 1 分間の反応を 30 サイクル行い、続いて 72  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。439bp の PCR 生成物を 1.5% の低融点アガロースゲルを用いて精製し、制限酵素 BamHI および HindIII により消化後、pUC19 ベクターにサブクローニングして、塩基配列を確認した。得られたクローンを pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Ha とした。このプラスミド中にコードされている再構成ヒト sle1220H 抗体の H 鎖 V 領域バージョン「a」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号 94 に示す。

次いで、再構成ヒト sle1220 (sle1220H) 抗体 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有する HindIII - BamHI DNA 断片を pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Ha より切出し、H 鎖発現ベクター HEF-12h-gr1 の HindIII - BamHI 部位に導入し、RV<sub>H</sub>-sle1220Ha を得た。

再構成ヒト sle1220H 抗体 H 鎖 V 領域の他のバージョン（「b」～「d」）を作成するため、2 つの変異誘発プ

ライマー  $s1e1220Hm1$  (配列番号95)、及び  $s1e1220Hm2$  (配列番号96) を合成した。各PCR反応では、実施例13で示されているVent DNAポリメラーゼ及び反応液組成を用いた。各PCR反応では、バージョン「b」及びバージョン「c」については、鋳型としての  $pUC-RV_H-s1e1220Ha$ 、50 pmoleの変異誘発プライマー  $s1e1220Hm1$  または  $s1e1220Hm2$  及び50 pmoleの末端プライマーBを含有する反応混合物を94℃1.5分間の変性の後、94℃1分、50℃1分、72℃1分の30サイクルの反応にかけ、次に72℃で10分間インキュベートした。235bpまたは178bpの生成物を1.5%の低融点アガロースゲルを用いて精製し、第2のPCR反応のプライマーとして使用した。すなわち、50 pmoleの末端プライマーAと、0.2 µgのPCR生成物を加え、 $pUC-RV_H-s1e1220Ha$  を鋳型として、第2PCR反応を行い、439bpの生成物を1.5%低融点アガロースゲルで精製、BamHI及びHindIIIで消化後pUC19ベクターにサブクローニングして、それぞれ構成ヒト  $s1e1220H$  抗体H鎖V領域バージョン「b」又は「c」をコードするプラスミド  $pUC-RV_H-s1e1220Hb$  又は  $pUC-RV_H-s1e1220Hc$  を得た。

再構成ヒト  $s1e1220H$  抗体H鎖V領域バージョン「d」をコードするDNAは次の様にして作製した。鋳型としての  $pUC-RV_H-s1e1220Hb$  を用いた。変異

誘導プライマー *sle1220Hm2* 及び末端プライマー *B* を  $50 \text{ pmole}$  ずつ用いて第1のPCR反応を30サイクル行った。得られた178bpのPCR生成物を1.6%の低融点アガロースゲルにより精製し、第2のPCRのプライマーとして用いた。このプライマーと  $50 \text{ pmole}$  の末端プライマー *A* を用いて第2のPCRを行い、439bpのDNA断片を得た。これを、精製し、*BamHI* 及び *HindIII* にて消化後 *pUC19* ベクターにサブクローニングし、スクレオチド配列を確認し、*pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Hd* を得た。

次いで、再構成ヒト *sle1220H* 抗体H鎖の各バージョンの発現ベクターを構築するため、再構成ヒト *sle1220H* 抗体H鎖V領域をコードするDNAを含む *BamHI-HindIII* 断片を *pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Hb*、*pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Hc*、および *pUC-RV<sub>H</sub>-sle1220Hd* より切り出し、H鎖発現ベクター *HEF-12h-gr1* の *HindIII-BamHI* 部位に挿入して、各発現ベクター、*RV<sub>H</sub>-sle1220Hb*、*RV<sub>H</sub>-sle1220Hc* および *RV<sub>H</sub>-sle1220Hd* をそれぞれ得た。

#### 分 析

再構成ヒト *sle1220H* 抗体H鎖を発現する4種類のベクターのうちの1つ (*RV<sub>H</sub>-sle1220Ha*、*RV<sub>H</sub>-sle1220Hb*、*RV<sub>H</sub>-sle1220Hc* または *RV<sub>H</sub>-sle1220Hd*) および、再構成ヒト12-

20 抗体 L 鎖を発現するベクター R V<sub>L</sub> - 1220 a を用いて COS 細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒト s l e 1220 H 抗体 H 鎖 V 領域の 4 種類のバージョンを、I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する能力について評価した。この結果を図 21 ~ 24 に示す。なお、これらの結果は、生産された抗体をプロテイン A によって精製した後に得られたものである。

上記のごとく、本発明によれば、キメラ L 鎖もしくは再構成 L 鎖又はキメラ H 鎖もしくは再構成 H 鎖の V 領域、そして特に R F 中の 1 個又は複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置換してもなおヒト I L - 6 R に結合する能力を維持している。従って本発明は、その本来の性質を維持している限り、1 個又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸により置換されている、キメラ抗体及び再構成ヒト抗体、キメラ L 鎖及び再構成 L 鎖、キメラ H 鎖及び再構成 H 鎖、再構成 L 鎖 V 領域、並びに再構成 H 鎖 V 領域、並びにこれらをコードする DNA をも包含する。

#### 参考例

本発明において使用される出発ハイブリドーマは次の様にして作製された。

#### 参考例 1. ハイブリドーマ MT18 の作製

ヒト I L - 6 R に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、免疫原として、細胞表面にヒト I L - 6 R を発現するマウス T 細胞を次の様にして作製した。すなわち、Y. H i r a t a ら、J. I m m u n o l.

V o l . 1 4 3 , 2 9 0 0 - 2 9 0 6 ( 1 9 8 9 ) に開示されているプラスミド p Z i p n e o I L - 6 R を常法に従ってマウス T 細胞系 C T L L - 2 ( A T C C T I B 2 1 4 ) にトランスフェクトし、生ずる形質転換体を常法に従って G 4 1 8 を用いてスクリーニングすることにより細胞あたり約 3 0 , 0 0 0 個のヒト I L - 6 R を発現する細胞株を得た。この細胞株を C T B C 3 と称する。

C T B C 3 細胞を常法に従って R P M I 1 6 4 0 中で培養し、そして培養細胞を P B S 緩衝液により 4 回洗浄し、そして  $1 \times 10^7$  個の細胞を C 5 7 B L / 6 マウスに腹腔内注射して免疫感作した。この免疫感作は 1 週間に 1 回 6 週間にわたって行った。

この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫 P 3 U 1 細胞を融合せしめ、そして融合した細胞を次の様にしてスクリーニングした。I L - 6 R 陰性ヒト T 細胞系 J U R K A T ( A T C C C R L 8 1 6 3 ) を、プラスミド p Z i p n e o I L - 6 R により同時トランスフェクトし、そして形質転換された細胞をスクリーニングして、細胞当たり約 1 0 0 , 0 0 0 個の I L - 6 R を発現する細胞系を得た。この細胞系を N J B C 8 と命名した。

N P - 4 0 で細胞溶解した N J B C 8 を認識するがしかし N P - 4 0 で細胞溶解した J U R K A T を認識しない抗体を生産するハイブリドーマ細胞系をクローン化しそして M T 1 8 と命名した。ハイブリドーマ M T 1 8 は、工業技術院微生

物工業技術研究所にブダペスト条約のもとに1990年7月10日に微工研条寄第2999号(FERM BP-2999)として寄託された。

#### 参考例2. ハイブリドーマPM1の作製

ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、抗原として、ヒトIL-6Rを次の様にして抽出した。3×10<sup>9</sup>個のヒト骨髓腫細胞(IL-6R生産細胞)を1mlの1%ジギトニン、10mMトリエタノールアミン緩衝液(pH7.4)、0.15M NaCl及び1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド;和光純薬)中で溶解した。他方、参考例1において調製したハイブリドーマMT18により生産されたMT18抗体を、ブロムシアンで活性化されたセファロース4B(Pharmacia)に常法に従って結合させた。このMT18抗体結合セファロース4Bを前記の細胞溶解物を混合することにより、セファロース4B上のMT18抗体に前記可溶化したIL-6Rを結合させた。セファロース4Bに非特異的に結合した物質を洗浄除去し、そしてSepharose 4BにMT18抗体を介して結合したIL-6Rを免疫原として使用した。

前記の免疫原を用いてBALB/cマウスを1週間に1回4週間にわたり腹腔内に免疫感作した。次に、この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫細胞P3U1と融合せしめた。融合した細胞を次のようにしてスクリーニングした。ま

ず、培養上清及び0.01mlのProtein Gセファロース (Pharmacia) を混合して上清中の免疫グロブリンをProtein Gセファロースに吸着せしめた。他方、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンにより内部標識された $10^{11}$ 個のU266細胞を溶解し、そしてMT18結合セファロース4Bを用いてIL-6Rをアフィニティ精製した。次に、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンで標識されたIL-6Rを、免疫グロブリンが結合している上記のProtein Gセファロースにより免疫沈降せしめ、そして沈澱をSDS-PAGEにより分析した。その結果、IL-6Rに特異的に結合する抗体を生産する1個のハイブリドーマクローンを単離し、そしてPM1と命名した。ハイブリドーマPM1は工業技術院微生物工業技術研究所にブダベスト条約のもとに1990年7月10日に、微工研条寄第2998号(FERM BP-2998)として寄託された。

参考例3. ハイブリドーマAUK12-20, AUK64-7及びAUK146-15の作製

免疫原として可溶性IL-6R (SR 344) を、Yasukawa, K. らの、J. Biochem. 108, 673-676, 1990、に記載されている方法に従って調製した。

すなわち、N-末端から345番目のコドンが終止コドンにより置換されているIL-6RをコードするcDNAを含有するプラスミドpECEdhfr344をCHO (5E27) 細胞にトランスフェクトし、そのトランスフェクトされ

た細胞を無血清培地 (SF-0 培地、三光純薬) 中で培養し、そして得られる上清を HF-Lab1 系 (東ソー) により濃縮しそして Blue-5PW カラム及び Phenyl-5PW カラムにより精製した。精製された可溶性 IL-6R は SDS-PAGE で単一バンドを示した。

雌性 BALB/c AnNCrj マウス (日本クレア) に、1 回の免疫原量を  $10 \mu\text{g}$  / マウスとして Freund の完全アジュバント (Bacto Adjuvant Complete H37Ra, Difco) と共に皮下注射し、そしてそれぞれ最初の注射の 2 週間及び 3 週間後に、Freund の不完全アジュバント (Bacto Adjuvant Incomplete Freund, Difco) と共に同量の免疫原を第二回及び第三回追加免疫として皮下注射した。最終免疫感作 (第四回注射) は第三回注射の 1 週間後に、アジュバントを使わないで尾静脈内に行った。免疫感作されたマウスから血清試料を採取し、希釈緩衝液により段階的に希釈し、そして Goldsmith, P. K., Analytical Biochemistry, 117, 53-60, 1981、に記載されている方法に従って ELISA 法により分析した。すなわち、SR344 ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) によりコートされたプレートを 1% BSA によりブロックし、そして前記の希釈された試料をそれに加えた。SR344 に結合したマウス IgG をヤギの抗-マウス IgG / アルカリホスファターゼ (A/P) (ZYMED) 及びアルカリホスファターゼ用基質 (Sigma-104) を用いて測定した。



血清中の抗-SR344抗体の増加を確認した後、最終免疫感作から3日後に、5匹のBALB/cマウスから脾臓細胞を得た。脾臓細胞及び骨髓細胞株(P3U1)を25:1の比率で混合し、PEG1500を用いて融合し、そして2000個のウェル中で $0.7 \sim 1.1 \times 10^6$ 細胞/ウェルの細胞濃度で培養した。ウェルからの上清を、SR344に結合するそれらの能力について(R344認識アッセイと称する第一次スクリーニング)、及びSR344とIL-6Rとの結合を阻害するそれらの能力について(IL-6/sIL6R結合阻害アッセイ(RBIA)による)スクリーニングした。第一次スクリーニングが240個の陽性ウェルをもたらし、そして第二次スクリーニングが36個の陽性ウェルをもたらした。

上記のSR344認識アッセイは次の様にして行った。ヤギの抗マウスIg(Cappel)( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )によりコートされたプレート(MaxiSorp, Nunc)を1%BSAによりブロックし、そして $100 \mu\text{l}$ /ウェルのハイブリドーマ培養上清をそれに添加し、次に室温にて1時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、 $20 \text{ ng}/\text{ml}$ のSR344をウェルに加え、そして室温にて1時間インキュベーションを行った。上清に由来する固定化された抗体により捕捉されたSR344の量を、ラビット抗SR344IgG(#2,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、ヤギの抗ラビットIgG-アルカリホスファターゼ(A/P)(1:3000, Tago)及び基質( $1 \text{ mg}/\text{ml}$ , Sigma-104)の添加、並びにそ

れに続く405-600nmでの吸光度の測定により定量した。

前記のRBI Aは次の様にして行った。MT18抗体でコートしたプレートを100ng/mlのSR344(100μl/ウェル)で満たし、そして室温にて1時間インキュベーションを行った。プレートを洗浄した後、50μl/ウェルのハイブリドーマ培養上清及び50μl/ウェルのビオチン-IL-6結合体(20ng/ml)をそれぞれのウェルに同時に加え、そしてウェルを室温にて1時間インキュベートした。ストレプトアビジン-A/P(1:7000, PIERCE)及び対応する基質(Sigma-104)を添加し、405-600nmでの吸光度を測定することにより、SR344に結合したビオチン-IL-6の量を測定した。

最後に、限界希釈法を2回反復することにより陽性クローンを純化し、そしてSR344とIL-6との結合を阻害する3個のハイブリドーマクローン、すなわちAUK12-20, AUK146-15及びAUK64-7;並びにSR344とIL-6との結合を阻害しないハイブリドーマクローンAUK181-6を得た。

#### 産業上の利用可能性

本発明はヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供し、この抗体においてはヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは抗原性が低いから、本発明の再構成

ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に療法用として期待される。

ブタペスト条約規則第 13 規則の 2 の寄託された微生物への言及

寄託機関 : National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited

あて名 : 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, UNITED KINGDOM

微生物の表示	寄託番号	寄託日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ pPM-h1	NCIMB 40362	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p12-h2	NCIMB 40363	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p64-h2	NCIMB 40364	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p146-h1	NCIMB 40365	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ pPM-k3	NCIMB 40366	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p12-k2	NCIMB 40367	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p64-k4	NCIMB 40368	1991年 2 月12日
<u>E. coli</u> DH5 $\alpha$ p146-k3	NCIMB 40369	1991年 2 月12日

寄託機関 : 通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

あて名 : 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号

微生物の表示	寄託番号	寄託日
MT18	FERM BP-2999	1990年 7 月10日
PM 1	FERM BP-2998	1990年 7 月10日

## 【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG

40

配列番号 : 2

配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

39

配列番号 : 3

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGS GTTG

40

配列番号 : 4

配列の長さ : 43

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG

43

配列番号 : 5

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTGAGCTTC

40

配列番号 : 6

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

37

112

配列番号 : 7

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTC A GATGGAGTC ACAKWYYCWG G

41

配列番号 : 8

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G

41

配列番号 : 9

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

35

113

配列番号 : 10

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT

37

配列番号 : 11

配列の長さ : 38

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

38

配列番号 : 12

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

27

114

配列番号 : 13

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

37

配列番号 : 14

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

配列番号 : 15

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT

37



115

配列番号 : 16

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGRACCTTG GGYTCAGCTT GRTTT

35

配列番号 : 17

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT

40

配列番号 : 18

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

37

116

配列番号 : 19

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

36

配列番号 : 20

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG

33

配列番号 : 21

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG

40

117

配列番号 : 22

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

37

配列番号 : 23

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

28

配列番号 : 24

配列の長さ : 393

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス

## 直接の起源

クローン : p12-k2

特徵： 1..60 sig peptide

61..393 mat peptide

配列

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
-20                      -15                      -10                      -5	
GGT TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT GCT TCC TTA GGT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Gly	
1                      5                      10	
GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser	
15                      20                      25	
GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA	192
Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
30                      35                      40	
GGA CAG ACA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC AAC CTA GAA TCT	240
Gly Gln Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
45                      50                      55                      60	
GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC	288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65                      70                      75	
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT	336
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
80                      85                      90	

119

CAG CAC AGT AGG GAG AAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG 384  
 Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 95 100 105

GAA ATA AAA 393  
 Glu Ile Lys  
 110

配列番号 : 25

配列の長さ : 405

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス

直接の起源

クローン : p12-h2

特徴 : 1..57 sig peptide

58..405 mat peptide

配列

ATG GGA TGG AGC GGG ATC TTT CTC TTC CTT CTG TCA GGA ACT GCA GGT 48  
 Met Gly Trp Ser Gly Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 -15 -10 -5

GTC CAC TCT GAG ATC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG ATG AAG 96  
 Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys

-1

5

10

120

CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
ACT AGC TAT TAC ATA CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT	192
Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT ACT AGC TAC AAC	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAA TCT TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAT CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGG GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	405
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115	

配列番号 : 26

配列の長さ : 381

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

## 起源

生物名：マウス

## 直接の起源

クローン : pPM-k3

特徵： 1..60 sig peptide

61..381 mat peptide

配列

ATG GTG TCC TCA GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA 48

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20                      -15                      -10                      -5

GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser

1

5

10

GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC 144

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp

15

20

25

ATT AGC AGT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT ATT 192

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile

30

35

40

AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AAC 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn

65

70

75

122

AAC CTG GAG CAA GAA GAC ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAC	336
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn	
80 85 90	
ACG CTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAT	381
Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	
95 100 105	

配列番号 : 27

配列の長さ : 411

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス

直接の起源

クローン : pPM-h1

特徴 : 1..54 sig peptide

55..411 mat peptide

配列

ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGG CTG TTC ACA GCC TTT CCT GGT ATC	48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile	
-15 -10 -5	
CTG TCT GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCG GGA CCT GTC CTG GTG AAG CCT	96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro	
-1 5 10	



123

TCT CAG TCT CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC 144  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30  
 AGT GAT CAT GCC TGG AGC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG 192  
 Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45  
 GAG TGG ATG GGC TAC ATA AGT TAC AGT GGT ATC ACT ACC TAC AAC CCA 240  
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro  
 50 55 60  
 TCT CTC AAA AGT CGA ATC TCT ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAG AAC CAG 288  
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75  
 TTC TTC CTA CAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GGG GAC ACG TCC ACA TAT 336  
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ser Thr Tyr  
 80 85 90  
 TAC TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT 384  
 Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 95 100 105 110  
 CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 411  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

配列番号 : 28

配列の長さ : 393

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：cDNA

## 起源

生物名：マウス

## 直接の起源

クローン : p64-k4

特徵： 1..60 sig peptide

61..393 mat peptide

配列

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
GGT TCC ACA GGT GAC ATT GTG TTG ATC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
-1 5 10	
GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser	
15 20 25	
GTT GAT AGT TAT GGC AAT AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA	192
Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
30 35 40	
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT	240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
45 50 55 60	
GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC	288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	

125

CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT 336  
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                     80                    85                    90  
 CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG 384  
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
                     95                    100                    105  
 GAG CTG AAA 393  
 Glu Leu Lys  
                     110

配列の番号 : 29

配列の長さ : 417

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス

直接の起源

クローン : p64-h2

特徴 : 1..57 sig peptide

58..417 mat peptide

配列

ATG GGA TGG AGC GGG GTC TTT ATC TTC CTC CTG TCA GTA ACT GCA GGT 48  
 Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

-15

-10

-5

126

GTC CAC TCC CAG GTT CAA TTG CAG CAG TCT GGA GCT GAG TTG ATG AAG	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys	
-1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATC TCC TGC AAG GCT ACT GGC TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
AGT AGT TAT TGG ATA GTG TGG ATA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT	192
Ser Ser Tyr Trp Ile Val Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA ACC GGT AGT ACT AAC TAC AAT	240
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn	
50 55 60	
GAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTC ACT GCA GAT ACA TCT TCC AAC	288
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC GTC	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGT CTA GAC AGC TCG GGC TAC TAT GCT ATG GAC TAT	384
Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA	417
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

配列の番号：30

配列の長さ : 381

45                      50                      55                      60

128

AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
AAC CTG GAG CAA GAA GAT ATT GCC AGT TAC TTT TGC CAA CAG GGT TAT	336
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr	
80 85 90	
ACG CCT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG TTG GAA ATC AAA	381
Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
95 100 105	

配列番号 : 31

配列の長さ : 402

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス

直接の起源

クローン : p146-h1

特徴 : 1..51 sig peptide

52..402 mat peptide

配列

ATG GAG CTG GAT CTT TAT CTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT GTC TAC	48
Met Glu Leu Asp Leu Tyr Leu Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr	
-15 -10 -5	

129

TCA CAG GTT CAG CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA CCT GGG 96  
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly  
 -1 5 10 15  
 GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AAC 144  
 Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn  
 20 25 30  
 TAC TGG GTG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG 192  
 Tyr Trp Val Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 ATT GGG TCT ATT TAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG AAC ACT CAG AAG 240  
 Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Asn Thr Gln Lys  
 50 55 60  
 TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC ATC ACA GCC 288  
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala  
 65 70 75  
 TAC ATG CAA CTC ACC AGC TTG GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC 336  
 Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 80 85 90 95  
 TGT GCA AGA TCG ACT GGT AAC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC 384  
 Cys Ala Arg Ser Thr Gly Asn His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 ACT CTC ACA GTC TCC TCA 402  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

130

配列番号 : 32

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACAAAGCTTC CACCATGGAG TCAGACACAC TCCTG

35

配列番号 : 33

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGCTAAGCTT CCACCATGGG ATGGAGCGGG ATCTTT

36

配列番号 : 34

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC

35



配列番号 : 35

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTTGGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTTA CCAGAG

36

配列番号 : 36

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGATTT ATTTCCAGCT TGGTC

35

配列番号 : 37

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC

35

配列番号 : 38

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACAAAGCTTC CACCATGGTG TCCTCAGCTC AGTTCC

36

配列番号 : 39

配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TGTTAGATCT ACTCACCTGA GGAGACAGTG ACTGAGGTT

39

配列番号 : 40

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTCTAAGCTT CCACCATGAG AGTGCTGATT CTTTTC

36

133

配列番号 : 41

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TACGCAAACC GCCTCTC

17

配列番号 : 42

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GAGTGCACCA TATGCGGT

18

配列番号 : 43

配列の長さ : 55

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACCGTGTCTG GCTACACCTT CACCAGCGAT CATGCCTGGA GCTGGGTGAG ACAGC

55

134

配列番号 : 44

配列の長さ : 63

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TGAGTGGATT GGATACATTA GTTATAGTGG AATCACAACC TATAATCCAT

50

CTCTCAAATC CAG

63

配列番号 : 45

配列の長さ : 54

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TATTATTGTG CAAGATCCCT AGCTCGGACT ACGGCTATGG ACTACTGGGG TCAA

54

配列番号 : 46

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTGACAATGC TGAGAGACAC CAGCAAG

27

135

配列番号 : 47

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGTGTCCT CCGATGTCCA ACTG

24

配列番号 : 48

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGTCTTGAGT GGATGGGATA CATTAGT

27

配列番号 : 49

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTGTCTGGCT ACTCAATTAC CAGCATCAT

29

136

配列番号 : 50

配列の長さ : 48

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TG TAGAGCCA GCCAGGACAT CAGCAGTTAC CTGAACTGGT ACCAGCAG

48

配列番号 : 51

配列の長さ : 42

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ATCTACTACA CCTCCAGACT GCACTCTGGT GTGCCAAGCA GA

42

配列番号 : 52

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACCTACTACT GCCAACAGGG TAACACGCTT CCATACACGT TCGGCCAAGG

50

137

配列番号 : 53

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

AGCGGTACCG ACTACACCTT CACCATC

27

配列番号 : 54

配列の長さ : 706

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : pUC-RVh-PM1f

特徴 : ヒト IL-6R に対する再構成ヒト化 PM-1 抗体の H 鎖 V 領域バージョン (f)

及びそれをコードする遺伝子

アミノ酸 -19-1 : leader

アミノ酸 1-30 : FR1

アミノ酸 31-36 : CDR1

アミノ酸 37-50 : FR2

アミノ酸 51-66 : CDR2

アミノ酸 67-98 : FR3

138

アミノ酸 99-108:CDR3

アミノ酸 109-119:FR4

ヌクレオチド 1-6 Hind III 部位

ヌクレオチド 54-135 intron

ヌクレオチド 258-348 intron/aberrant splicing

ヌクレオチド 505-706 intron

ヌクレオチド 701-706 Bam HI 部位

## 配列

AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT	49
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala	
-15 -10	
ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA	103
Thr	
-5	
CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC CAG GTC CAA	155
Gly Val His Ser Gln Val Gln	
1	
CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC	203
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser	
5 10 15	
CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG	251
Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp	
20 25 30 35	
AGC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC	299
Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	
40 45 50	



139

ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA	347
Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg	
55 60 65	
GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC	395
Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu	
70 75 80	
AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC	443
Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser	
85 90 95	
CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC	491
Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val	
100 105 110 115	
ACA GTC TCC TCA G GTGAGTCCTT ACAACCTCTC TCTTCTATTC AGCTTAAATA	544
Thr Val Ser Ser	
GATTTTACTG CATTGTGTTGG GGGGGAAATG TGTGTATCTG AATTTTCAGGT CATGAAGGAC	604
TAGGGACACC TTGGGAGTCA GAAAGGGTCA TTGGGAGCCC GGGCTGATGC AGACAGACAT	664
CCTCAGCTCC CAGACTTCAT GGCCAGAGAT TTATAGGGAT CC	706

配列番号 : 55

配列の長さ : 506

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

起源

生物名 : マウス及びヒト

新たな用紙

## 直接の起源

クローン : pUC-RV1-PM1a

特徴 : ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM-1抗体のL鎖V領域バージョン(a)

及びそれをコードする遺伝子

アミノ酸 -19--1 : leader

アミノ酸 1-23 : FR1

アミノ酸 24-34 : CDR1

アミノ酸 35-49 : FR2

アミノ酸 50-56 : CDR2

アミノ酸 57-88 : FR3

アミノ酸 89-97 : CDR3

アミノ酸 98-117:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 54-135: intron

ヌクレオチド 268-376: intron/aberrant splicing

ヌクレオチド 469-506: intron

ヌクレオチド 501-506: Bam HI 部位

## 配列

AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT 49

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala

-15

-10

ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA 103

Thr

-5

CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC GAC ATC CAG 155

Gly Val His Ser Asp Ile Gln

141

ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG 203  
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
           5                  10                  15  
 ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG 251  
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp  
           20                  25                  30                  35  
 TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC 299  
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr  
                   40                  45                  50  
 TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC 347  
 Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
                   55                  60                  65  
 GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC 395  
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile  
                   70                  75                  80  
 GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC 443  
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly  
                   85                  90                  95  
 CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C GTGAGTAGAA TTAAACTTT 488  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100                  105  
 GCTTCCTCAG TTGGATCC 506

配列番号 : 56

配列の長さ : 438

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RVh-PM1f-4

特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM-1抗体のH鎖V領域バージョン(f)  
及びそれをコードする遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19- -1 : leader

アミノ酸 1-30 : FR1

アミノ酸 31-36 : CDR1

アミノ酸 37-50 : FR2

アミノ酸 51-66 : CDR2

アミノ酸 67-98 : FR3

アミノ酸 99-108 : CDR3

アミノ酸 109-119 : FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 432-438 : Bam HI 部位

配列

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA	50
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr	
-15	-10
GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT	98
Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly	
-5	1
	5
	10

143

CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC	146
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly	
15 20 25	
TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG AGC TGG GTT CGC CAG CCA CCT	194
Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro	
30 35 40	
GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA	242
Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr	
45 50 55	
ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC	290
Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr	
60 65 70	
AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC	338
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp	
75 80 85 90	
ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG	386
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met	
95 100 105	
GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC ACA GTC TCC TCA G GTGAGTGGAT	436
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115	
CC	438

配列番号 : 57

配列の長さ : 402

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RV1-PM1a

特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化PM-1抗体のL鎖V領域バージョン(a)  
及びそれをコードする遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19--1:leader

アミノ酸 1-23:FR1

アミノ酸 24-34:CDR1

アミノ酸 35-49:FR2

アミノ酸 50-56:CDR2

アミノ酸 57-88:FR3

アミノ酸 89-97:CDR3

アミノ酸 98-107:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 397-402: Bam HI 部位

配列

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 50

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr

-15

-10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC 98

Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5

1

5

10

145

CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC 146  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
                   15                  20                  25  
 CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG 194  
 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
                   30                  35                  40  
 GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG 242  
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val  
                   45                  50                  55  
 CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC 290  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
                   60                  65                  70  
 ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG 338  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
                   75                  80                  85                  90  
 GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC 386  
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
                   95                  100                  105  
 AAA C GTGAGTGGAT CC 402  
 Lys

配列番号 : 58

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

146

## 配列

TAAGGATCCA CTCACCTGAG GAGACTGTGA CGAGGC

36

配列番号 : 59

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

ATCAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TC

32

配列番号 : 60

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

AATGGATCCA CTCACGTTTG ATTTCCACCT

30

配列番号 : 61

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA



147

## 配列

CATGCCTGGA GCTGGGTTCG CCAGCCACCT GGA

33

配列番号 : 62

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

TCCAGGTGGC TGGCGAACCC AGCTCCAGGC ATG

33

配列番号 : 63

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

CAGCAGAAGC CAGGAAAGGC TCCAAAGCTG

30

配列番号 : 64

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

CAGCTTTGGA GCCTTTCCTG GCTTCTGCTG

30

配列番号 : 65

配列の長さ : 66

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

ACCTGTAGAG CCAGCAAGAG TGTTAGTACA TCTGGCTATA GTTATATGCA

50

CTGGTACCAG CAGAAG

66

配列番号 : 66

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

## 配列

GCTGGCTCTA CAGGT

15

配列番号 : 67

配列の長さ : 48

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

149

配列の種類：合成DNA

配列

AAGCTGCTGA TCTACCTTCC ATCCACCCTG GAATCTGGTG TGCCAAGC

48

配列番号：68

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTAGATCAGC AGCTT

15

配列番号：69

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCTACCTACT ACTGCCAGCA CAGTAGGGAG ACCCCATACA CGTTCGGC

48

配列番号：70

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTGGCAGTAG GTAGC

15

配列番号：71

配列の長さ：414

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RV1-1220a

特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化AUK12-20抗体のL鎖V領域バージョン

(a)及びそれをコードする遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19-1:leader

アミノ酸 1-23:FR1

アミノ酸 24-38:CDR1

アミノ酸 39-53:FR2

アミノ酸 54-60:CDR2

アミノ酸 61-92:FR3

アミノ酸 93-101:CDR3

アミノ酸 102-111:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 408-414: Bam HI 部位

151

## 配列

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 50  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr  
 -15 -10  
 GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC 98  
 Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 -5 -1 1 5 10  
 CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC 146  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 15 20 25  
 AAG AGT GTT AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAG CAG 194  
 Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln  
 30 35 40  
 AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC CTT GCA TCC AAC CTG 242  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu  
 45 50 55  
 GAA TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC 290  
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 60 65 70  
 TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC 338  
 Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr  
 75 80 85 90  
 TAC TGC CAG CAC AGT AGG GAG AAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC 386  
 Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 95 100 105

152

AAG GTG GAA ATC AAA CGTGAGTGGA TCC

414

Lys Val Glu Ile Lys

110

配列番号 : 72

配列の長さ : 45

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GGTTATTCAT TCACTAGTTA TTACATACAC TGGGTTAGAC AGGCC

45

配列番号 : 73

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGTGAATGAA TAACCGCTAG CTTTACA

27

配列番号 : 74

配列の長さ : 69

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAGTGGGTGG GCTATATTGA TCCTTTCAAT GGTGGTACTA GCTATAATCA 50

GAAGTTCAAG GGCAGGGTT 69

配列番号：75

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATAGCCCACC CACTC 15

配列番号：76

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGGGTAACC GCTTTGCTTA CTGGGGACAG GGTACC 36

配列番号：77

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGCAAAGCGG TTACCCCTC TGGCGCAGTA GTAGAC

36

配列番号：78

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAAGGTTACC ATGACCGTGG ACACCTCTAC

30

配列番号：79

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CACGGTCATG GTAACCTTGC CCTTGAACCTT

30

配列番号：80

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖



155

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGGCTCGAAT GGATTGGCTA TATTGATCCT

30

配列番号：81

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGGATCAATA TAGCCAATCC ATTCGAGCCC

30

配列番号：82

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTAAAACGAG GCCAGT

16

配列番号：83

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AACAGCTATG ACCATGA

17

配列番号：84

配列の長さ：433

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：pUC-RVh-1220b

特徴：ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化AUK12-20抗体のH鎖V領域バージョン

(b)及びそれをコードする遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19-1:leader

アミノ酸 1-30:FR1

アミノ酸 31-35:CDR1

アミノ酸 36-49:FR2

アミノ酸 50-66:CDR2

アミノ酸 67-98:FR3

アミノ酸 99-105:CDR3

アミノ酸 106-116:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 427-433: Bam HI 部位

157

## 配列

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC 51  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala  
 -15 -10  
 GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC 99  
 Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 -5 -1 1 5  
 GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC 147  
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 10 15 20 25  
 GGT TAT TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCA 195  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 30 35 40  
 GGC CAA GGG CTC GAG TGG GTG GGC TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT 243  
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly  
 45 50 55  
 ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GTT ACC ATG ACC GTG GAC 291  
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Val Asp  
 60 65 70  
 ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG 339  
 Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
 75 80 85  
 GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC 387  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr  
 90 95 100 105

158

TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA GGTGAGTGGA TCC 433  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

配列番号 : 85

配列の長さ : 433

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : pUC-RVh-1220d

特徴 : ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト化AUK12-20抗体のH鎖V領域バージョン

(d)及びそれをコードする遺伝子であって、intronが除去されたもの。

アミノ酸 -19-1:leader

アミノ酸 1-30:FR1

アミノ酸 31-35:CDR1

アミノ酸 36-49:FR2

アミノ酸 50-66:CDR2

アミノ酸 67-98:FR3

アミノ酸 99-105:CDR3

アミノ酸 106-116:FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 427-433: Bam HI 部位

新たな用紙

159

## 配列

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC 51  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala  
 -15 -10  
 GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC 99  
 Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 -5 -1 1 5  
 GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC 147  
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 10 15 20 25  
 GGT TAT TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCA 195  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 30 35 40  
 GGC CAA GGG CTC GAA TGG ATT GGC TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT 243  
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly  
 45 50 55  
 ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GTT ACC ATG ACC GTG GAC 291  
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Val Asp  
 60 65 70  
 ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG 339  
 Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
 75 80 85  
 GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC 387  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr  
 90 95 100 105

160

TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA GGTGAGTGGA TCC 433  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

配列番号 : 86

配列の長さ : 90

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GATAAGCTTG CCGCCACCAT GGACTGGACC TGGAGGGTCT TCTTCTTGCT 50  
GGCTGTAGCT CCAGGTGCTC ACTCCCAGGT GCAGCTTGTC 90

配列番号 : 87

配列の長さ : 90

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CACTCCCAGG TGCAGCTTGT GCAGTCTGGA GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG 50  
GGCCTCAGTG AAGGTTTCCT GCAAGGCTTC TGGATACTCA 90

配列番号 : 88

配列の長さ : 90

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGCAAGGCTT CTGGATACTC ATTCAGTAGT TATTACATAC ACTGGGTGCG

50

CCAGGCCCCC GGACAAAGGC TTGAGTGGAT GGGATATATT

90

配列番号：89

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTTGAGTGGA TGGGATATAT TGACCCTTTC AATGGTGGTA CTAGCTATAA

50

TCAGAAGTTC AAGGGCAGAG TCACCATTAC CGTAGACACA

90

配列番号：90

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTCACCATTA CCGTAGACAC ATCCGCGAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG

50

CAGCCTGAGA TCTGAAGACA CGGCTGTGTA TTA CTGTGCG

90

配列番号 : 91

配列の長さ : 94

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGGGGGT AACCGCTTTG CTTACTGGGG

50

CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGG TGAGTGGATC CGAC

94

配列番号 : 92

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GATAAGCTTG CCGCC

15

配列番号 : 93

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTCGGATCCA CTCAC

15



163

配列番号 : 94

配列の長さ : 433

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

起源

生物名 : マウス及びヒト

直接の起源

クローン : pUC-RV<sub>H</sub> -sle 1220Ha

特徴 : ヒトIL-6Rに対する再構成ヒトsleAUK12-20抗体のH鎖V領域バージョン

「a」及びそれをコードする遺伝子。

アミノ酸 -19- -1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

アミノ酸 36-49: FR2

アミノ酸 50-66: CDR2

アミノ酸 67-98: FR3

アミノ酸 99-105: CDR3

アミノ酸 109-116: FR4

ヌクレオチド 1-6 : Hind III 部位

ヌクレオチド 427-433: Bam HI 部位

配列

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala

-15

-10

164

GTA GCT CCA GGT GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTT GTG CAG TCT GGA GCT	99
Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala	
-5 -1 1 5	
GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT	147
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser	
10 15 20 25	
GGA TAC TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTG CGC CAG GCC CCC	195
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
30 35 40	
GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TAT ATT GAC CCT TTC AAT GGT GGT	243
Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly	
45 50 55	
ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC GTA GAC	291
Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp	
60 65 70	
ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGT CTG AGA TCT GAA	339
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu	
75 80 85	
GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC	387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr	
90 95 100 105	
TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGTGAGTGGA TCC	433
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

配列番号 : 95

配列の長さ : 27

165

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGGCTTGAGT GGATTGGATA TATTGAC

27

配列番号：96

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGTTCAAGG GCAAGGTCAC CATTACC

27

配列番号：97

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTGCTTCCG TGAAAGTCAG CTGTAAAGCT

30

配列番号：98

配列の長さ：30

166

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGCTTTACAG CTGACTTTCA CGGAAGCACC

30

## 請求の範囲

1. ヒトインターロイキン-6受容体 (IL-6R) に対するマウスモノクローナル抗体のライト鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域)。

2. 配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項1に記載のL鎖V領域。

3. ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のヘビー鎖 (H鎖) V領域。

4. 配列番号25, 27, 29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項3に記載のH鎖V領域。

5. (1) ヒトL鎖定常領域 (C領域)、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖; 並びに

(2) ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖;

を含んで成るキメラ抗体。

6. 前記マウスL鎖V領域が配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、そして前記マウスH鎖V領域が配列番号25, 27, 29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項5に記載のキメラ抗体。

7. ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の相補性決定領域 (CDR)。

8. 配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示さ

れるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 により定義される、請求項 7 に記載の C D R。

9. ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R。

10. 配列番号 25, 27, 29 及び 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 により定義される、請求項 9 に記載の C D R。

11. (1) ヒト L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (F R)、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成るヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成 (r e s h a p e d) ヒト L 鎖 V 領域。

12. 前記 C D R が配列番号 24, 26, 28 及び 30 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 により定義される、請求項 11 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域。

13. 前記 F R がヒト抗体 R E I に由来する、請求項 11 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域。

14. 表 2 において R V<sub>L</sub> a 又は R V<sub>L</sub> b として示されるアミノ酸配列を有する請求項 11 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域。

15. 表 5 において R V<sub>L</sub> として表わされるアミノ酸配列を有する請求項 11 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域。

16. (1) ヒト H 鎖 V 領域の F R、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖 V 領域。

17. 前記 C D R が配列番号 25, 27, 29 及び 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 により定義される、請求項 16 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域。

18. 前記 F R がヒト抗体 N E W 又は H A X に由来する、請求項 16 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域。

19. 表 3 に R V<sub>H</sub> a, R V<sub>H</sub> b, R V<sub>H</sub> c, R V<sub>H</sub> d, R V<sub>H</sub> e、又は R V<sub>H</sub> f として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 16 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域。

20. 表 6 における R V<sub>H</sub> a, R V<sub>H</sub> b, R V<sub>H</sub> c もしくは R V<sub>H</sub> d、又は表 7 における R V<sub>H</sub> a, R V<sub>H</sub> b, R V<sub>H</sub> c もしくは R V<sub>H</sub> d として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 17 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域。

21. (1) ヒト L 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト L 鎖 F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 C D R を含んで成る L 鎖 V 領域、  
を含んで成るヒト I L - 6 R に対する再構成ヒト抗体の L 鎖。

22. 前記ヒト L 鎖 C 領域がヒト γ - I C 領域であり、ヒト L 鎖 F R が R E I に由来し、前記 L 鎖 C D R が配列番号 24, 26, 28 及び 30 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲は表 9 に定義される通りであ

る、請求項 2 1 に記載の再構成ヒト抗体 L 鎖。

2 3. 前記 L 鎖 V 領域が表 2 において  $RV_L a$  又は  $RV_L b$  として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 1 に記載の再構成ヒト抗体 L 鎖。

2 4. 前記 L 鎖 V 領域が表 5 において  $RV_L$  として表わされるアミノ酸配列を有する、請求項 2 1 に記載の再構成ヒト抗体 L 鎖。

2 5. (1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト H 鎖 FR、及びヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 CDR を含んで成る H 鎖 V 領域、を含んで成るヒト IL-6 R に対する再構成ヒト抗体の H 鎖。

2 6. 前記ヒト H 鎖 C 領域がヒト  $\kappa$  C 領域であり、前記ヒト H 鎖 FR が NEW 又は HAX に由来し、前記 H 鎖 CDR が配列番号 2 5, 2 7, 2 9 及び 3 1 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 において定義される通りである、請求項 2 5 に記載の再構成ヒト抗体 H 鎖。

2 7. 前記 H 鎖 V 領域が表 3 に  $RV_H a$ ,  $RV_H b$ ,  $RV_H c$  又は  $RV_H d$  として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 5 に記載の再構成ヒト抗体 H 鎖。

2 8. 前記 H 鎖 V 領域が表 6 における  $RV_H a$ ,  $RV_H b$ ,  $RV_H c$  もしくは  $RV_H d$  又は表 7 における  $RV_H a$ ,  $RV_H b$ ,  $RV_H c$  又は  $RV_H d$  として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 5 に記載の再構成ヒト抗体 H 鎖。

2 9. (A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、及び



(2) ヒト L 鎖 F R、及びヒト I L-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 C D R を含んで成る L 鎖 V 領域、を含んで成る L 鎖；並びに

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト H 鎖 F R、及びヒト I L-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 C D R を含んで成る H 鎖 V 領域、を含んで成る H 鎖；

を含んで成るヒト I L-6 R に対する再構成ヒト抗体。

30. 前記 L 鎖 C D R が配列番号 24, 26, 28 及び 30 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 に定義される通りであり；H 鎖 C D R が配列番号 25, 27, 29 及び 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 において定義される通りであり；ヒト L 鎖 F R が R E I に由来し；前記ヒト H 鎖 F R が N E W 又は H A X に由来し、前記ヒト L 鎖 C 領域はヒト  $\gamma$ -I C 領域であり；そして前記ヒト H 鎖 C 領域はヒト  $\kappa$  C 領域である、請求項 29 に記載の再構成ヒト抗体。

31. 前記 L 鎖 V 領域が表 2 において R V<sub>L</sub> a 又は R V<sub>L</sub> b として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の再構成ヒト抗体。

32. 前記 L 鎖 V 領域が表 5 において R V<sub>L</sub> として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の再構成ヒト抗体。

33. 前記 H 鎖 V 領域が表 3 に R V<sub>H</sub> a, R V<sub>H</sub> b, R V<sub>H</sub> c, R V<sub>H</sub> d, R V<sub>H</sub> e、又は R V<sub>H</sub> f として示されるアミ

ノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の再構成ヒト抗体。

34. 前記 H 鎖 V 領域が表 6 における  $RV_H a$ ,  $RV_H b$ ,  $RV_H c$  もしくは  $RV_H d$  又は表 7 における  $RV_H a$ ,  $RV_H b$ ,  $RV_H c$  もしくは  $RV_H d$  として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の再構成ヒト抗体。

35. ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域をコードする DNA。

36. 前記 L 鎖 V 領域が配列番号 24, 26, 28 及び 30 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項 35 に記載の DNA。

37. ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域をコードする DNA。

38. 前記 H 鎖 V 領域が配列番号 25, 27, 29 及び 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する、請求項 37 に記載の DNA。

39. ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の CDR をコードする DNA。

40. 前記 CDR が配列番号 24, 26, 28 及び 30 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 に定義される請求項 39 に記載の CDR をコードする DNA。

41. ヒト IL-6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の CDR をコードする DNA。

42. 前記 CDR が配列番号 25, 27, 29 及び 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の

範囲が表 9 において定義される、請求項 4 1 に記載の C D R をコードする D N A。

4 3. (1) ヒト L 鎖 V 領域の F R、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする D N A。

4 4. 前記 C D R が配列番号 2 4, 2 6, 2 8 及び 3 0 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表 9 に定義される、請求項 4 3 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする D N A。

4 5. 前記 F R が R E I に由来する、請求項 4 3 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする D N A。

4 6. 前記 L 鎖 V 領域が表 2 における R V<sub>L</sub> a 又は R V<sub>L</sub> b として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 3 に記載の D N A。

4 7. 前記 L 鎖 V 領域が表 5 における R V<sub>L</sub> として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 3 に記載の D N A。

4 8. 配列番号 5 7 に示されるヌクレオチド配列を有する請求項 4 3 に記載の D N A。

4 9. (1) ヒト H 鎖 V 領域の F R、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R、  
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする D N A。

50. 前記CDRが配列番号25, 27, 29及び31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列の範囲が表9に定義される、請求項49に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

51. 前記FRがNEW又はHAXに由来する、請求項49に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

52. H鎖V領域が表3にRV<sub>H</sub>a, RV<sub>H</sub>b, RV<sub>H</sub>c, RV<sub>H</sub>d, RV<sub>H</sub>e、又はRV<sub>H</sub>fとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項49に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

53. 前記H鎖V領域が表6におけるRV<sub>H</sub>a, RV<sub>H</sub>b, RV<sub>H</sub>cもしくはRV<sub>H</sub>d又は表7におけるRV<sub>H</sub>a, RV<sub>H</sub>b, RV<sub>H</sub>cもしくはRV<sub>H</sub>dとして示されるアミノ酸配列を有する、請求項49に記載のDNA。

54. 配列番号56に示されるヌクレオチド配列を有する、請求項49に記載のDNA。

55. (1) ヒトL鎖C領域；並びに

(2) ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るL鎖V領域；

を含んで成るヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトL鎖をコードするDNA。

56. 前記L鎖V領域が配列番号57に示されるヌクレオチド配列を有する請求項55に記載のDNA。

57. (1) ヒトH鎖C領域；並びに

(2) ヒトFR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノ

クローナル抗体のCDRを含んで成るH鎖V領域；

を含んで成るヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトH鎖をコードするDNA。

58. 前記H鎖V領域が配列番号56に示されるヌクレオチド配列を有する請求項57に記載のDNA。

59. 請求項35, 37, 39, 41, 43, 49, 55及び57のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクター。

60. 請求項35, 37, 39, 41, 43, 49, 55及び57のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクターにより形質転換された宿主細胞。

61. (1) ヒトL鎖C領域；及び

(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体のキメラL鎖をコードするDNA。

62. (1) ヒトH鎖C領域；及び

(2) ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する抗体のキメラH鎖をコードするDNA。

63. ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法であって、

請求項61に記載のDNAを含んで成る発現ベクター及び請求項62に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより

同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして  
目的とする抗体を回収する、  
段階を含んで成る方法。

64. ヒト IL-6 R に対する再構成ヒト抗体の製造方法  
であって、

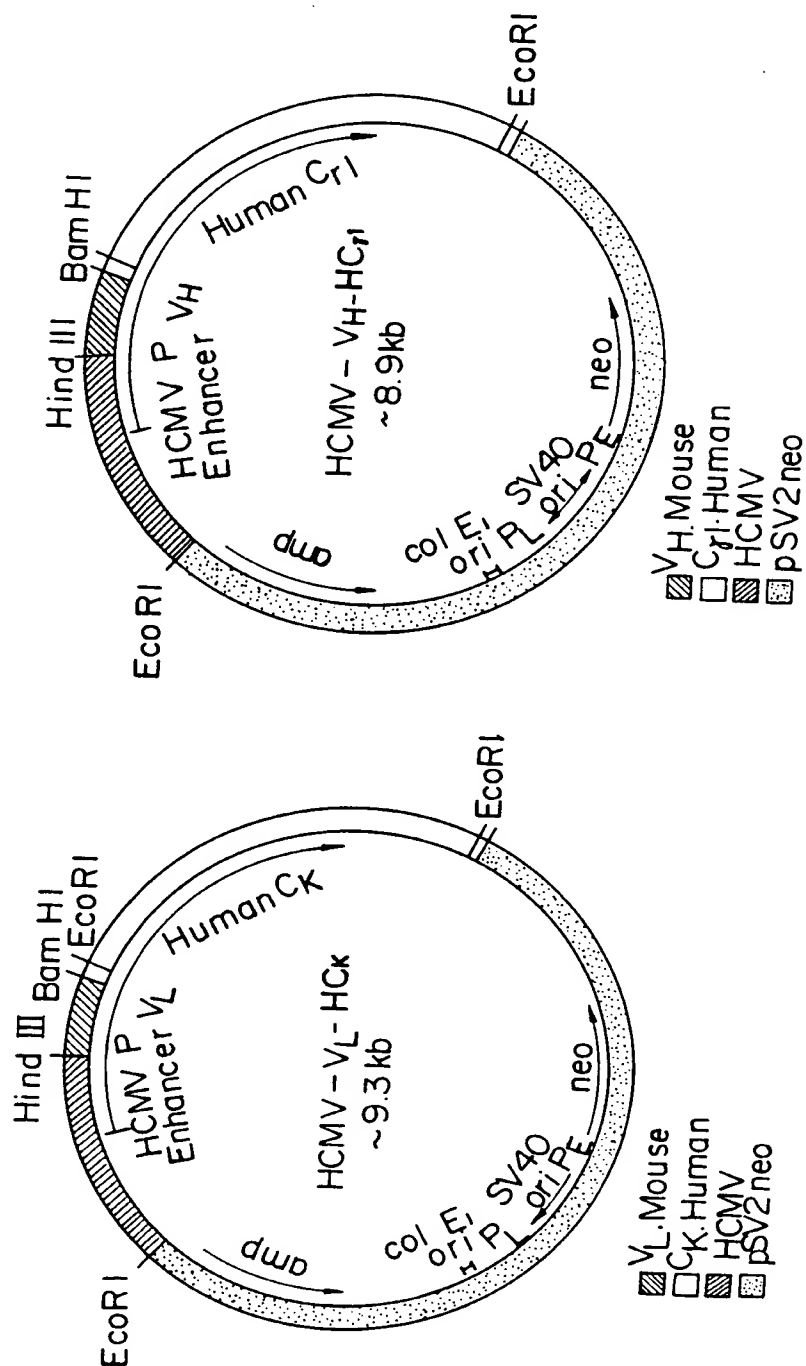
請求項 55 に記載の DNA を含んで成る発現ベクター及び  
請求項 57 に記載の DNA を含んで成る発現ベクターにより  
同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして  
目的とする抗体を回収する、  
ことを含んで成る方法。

65. 配列番号 85, 86 又は 94 に示すヌクレオチド配  
列を有する、請求項 49 に記載の DNA。

66. 配列番号 71 に示すヌクレオチド配列を有する、請  
求項 43 に記載の DNA。

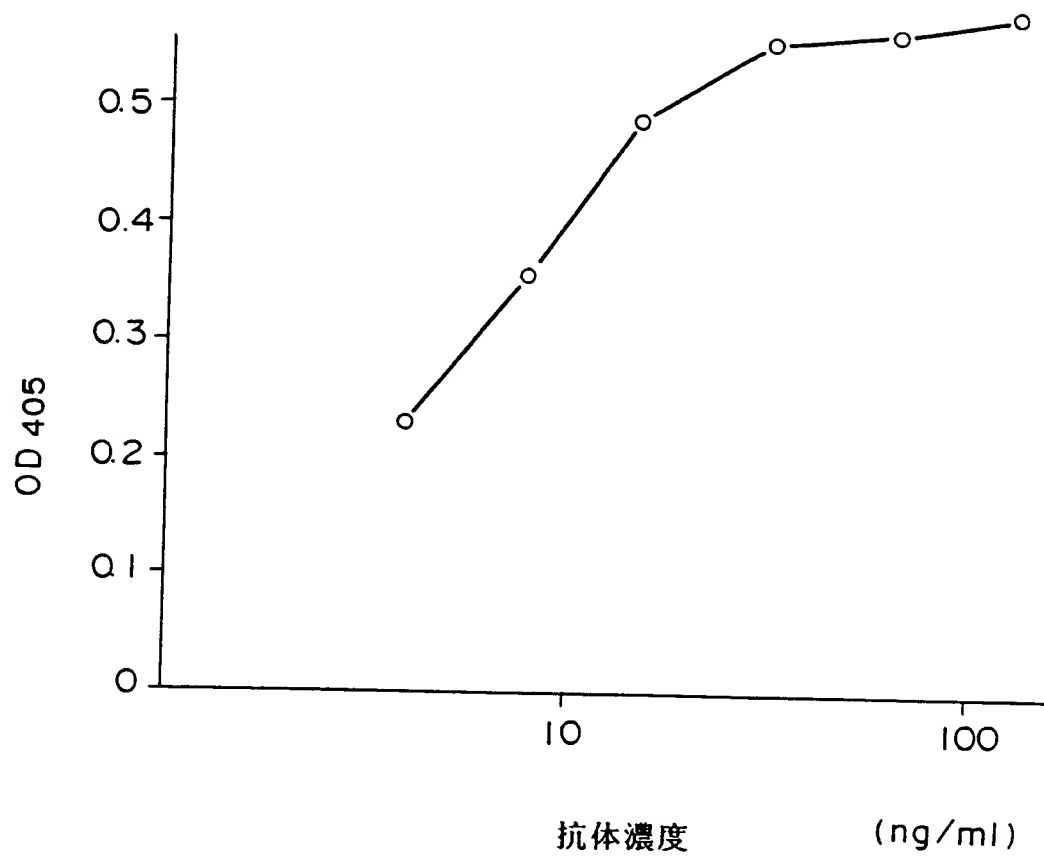
1/24

Fig. 1



2/24

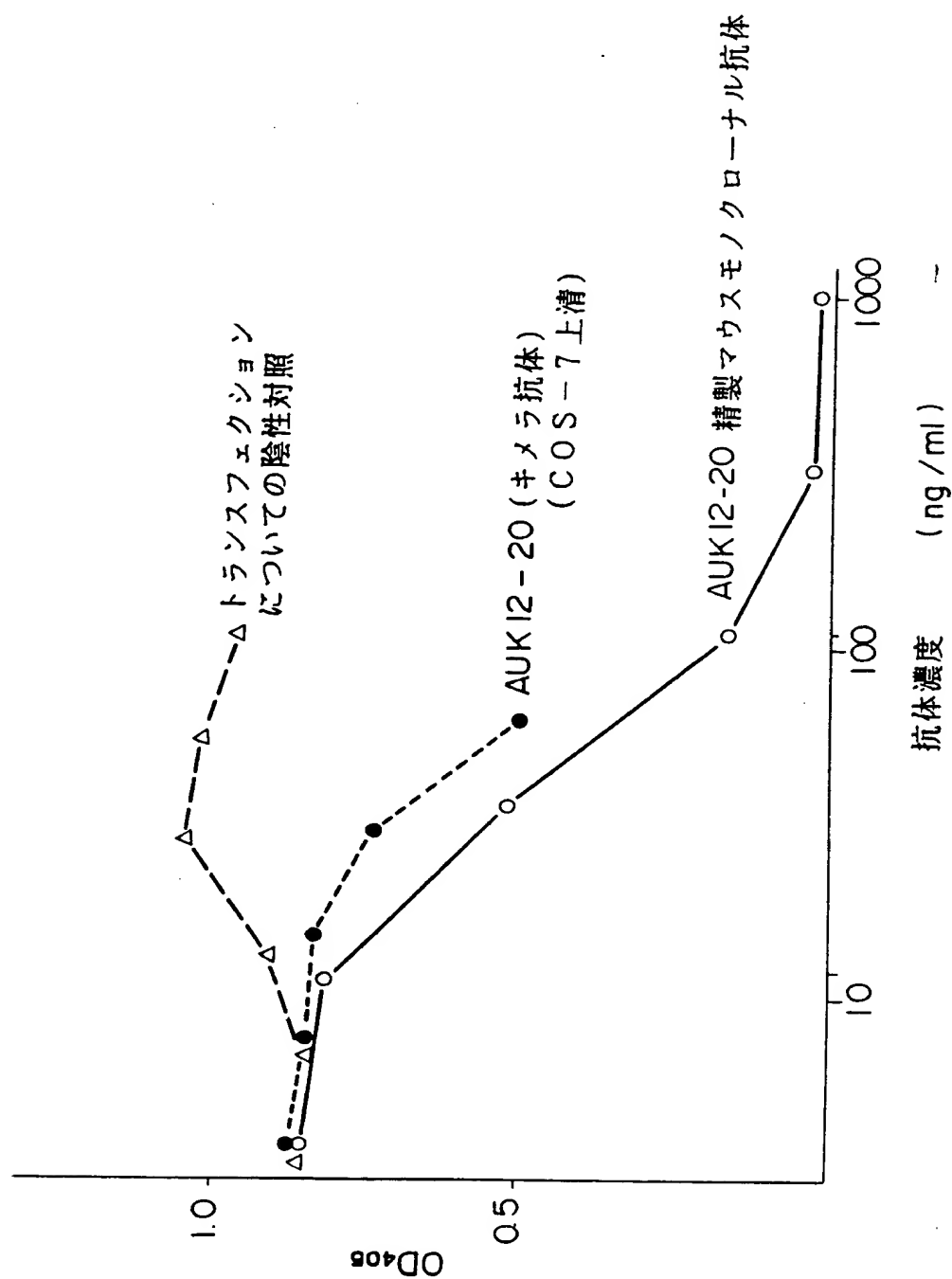
Fig.2





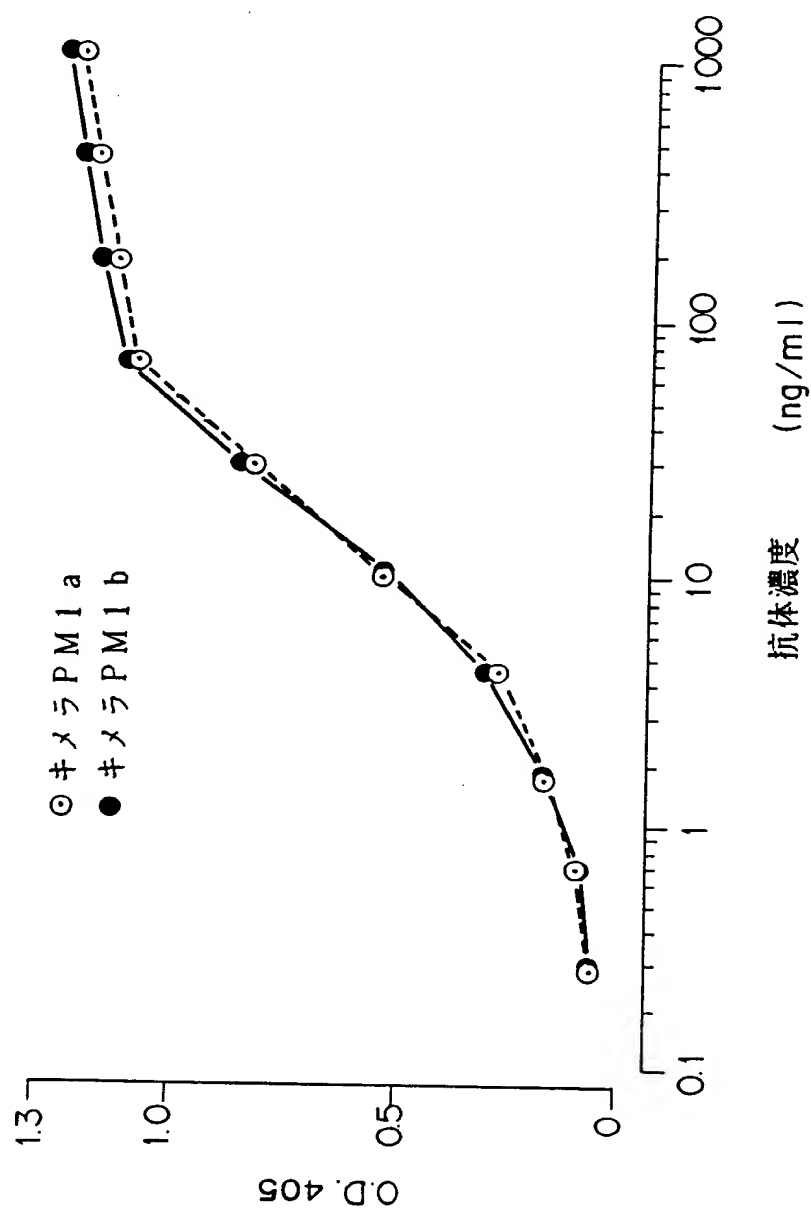
3/24

Fig. 3



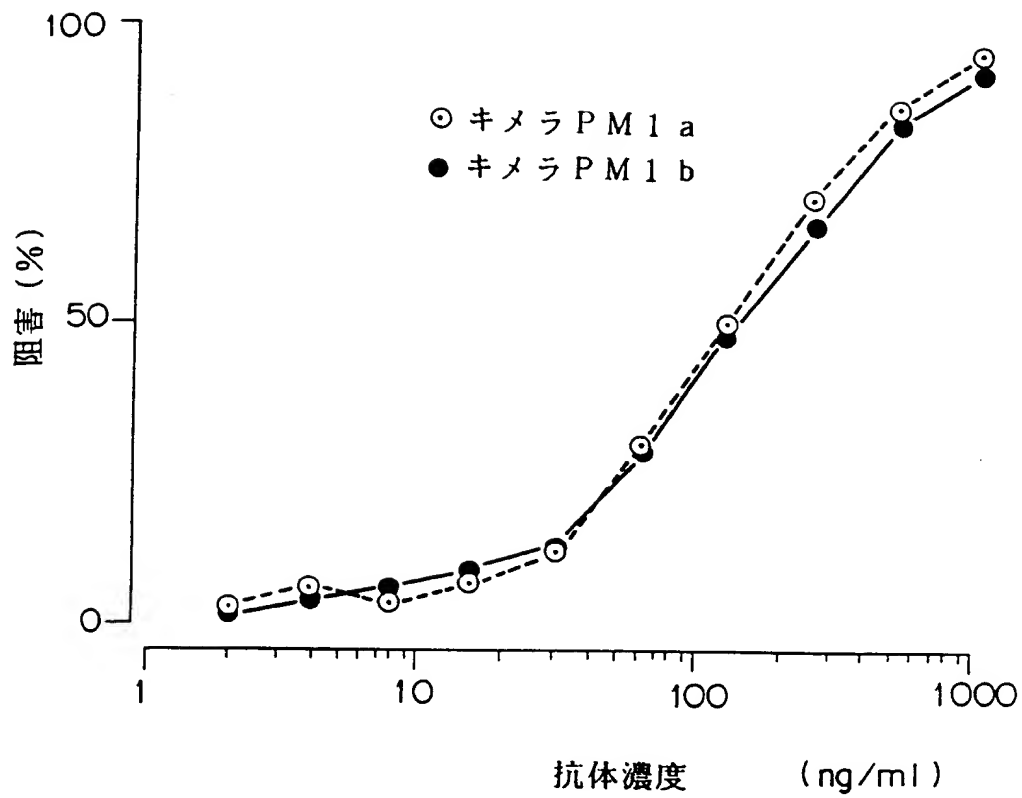
4/24

Fig.4



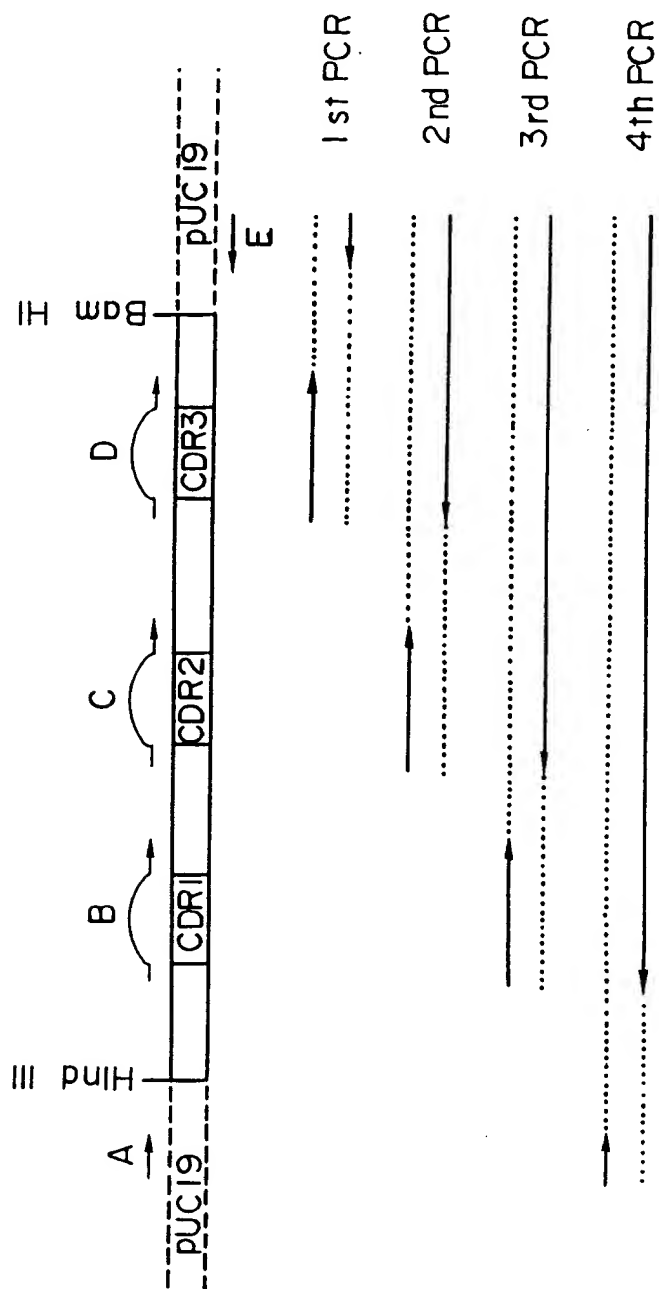
5/24

Fig.5



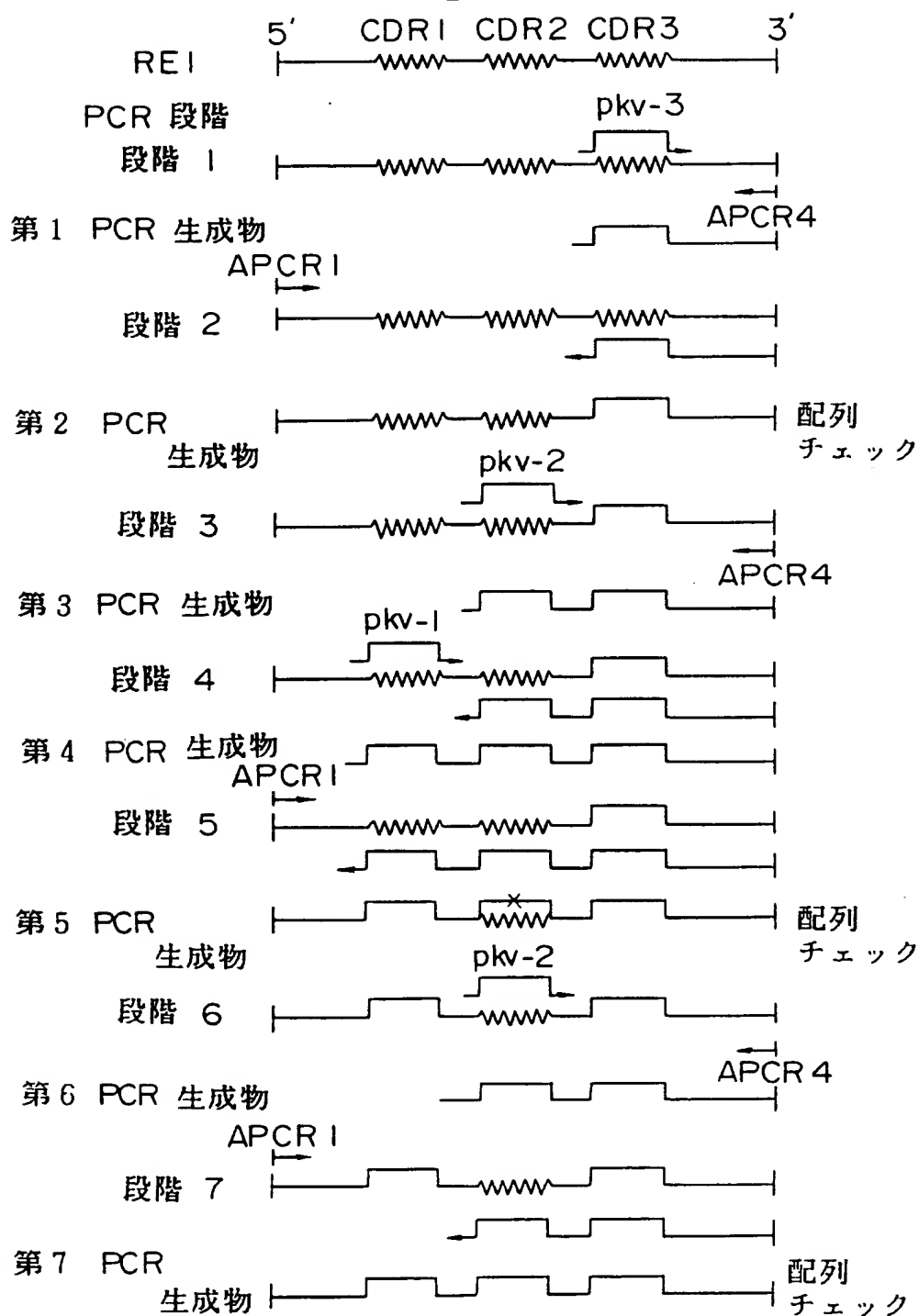
6/24

Fig.6



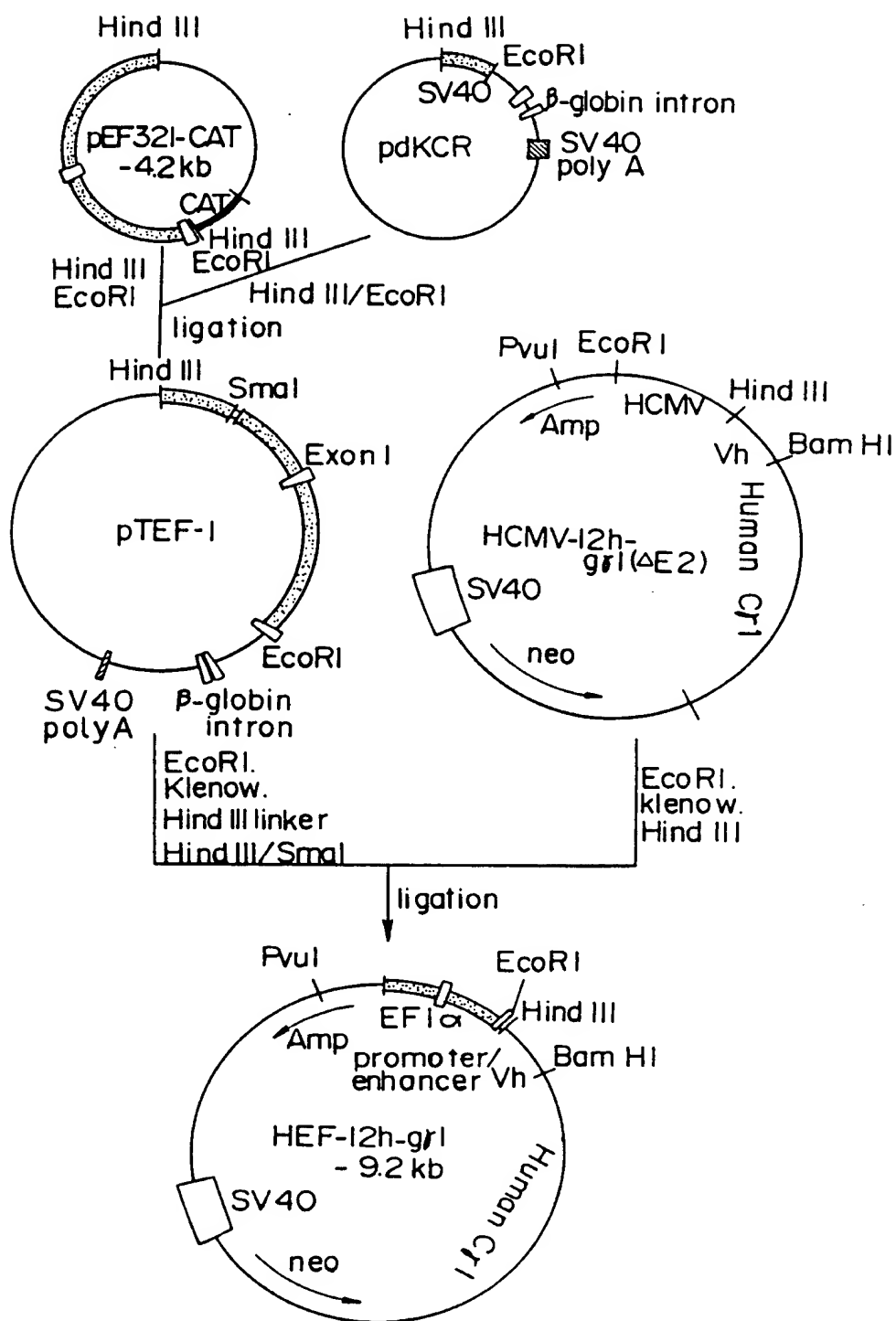
7/24

Fig.7



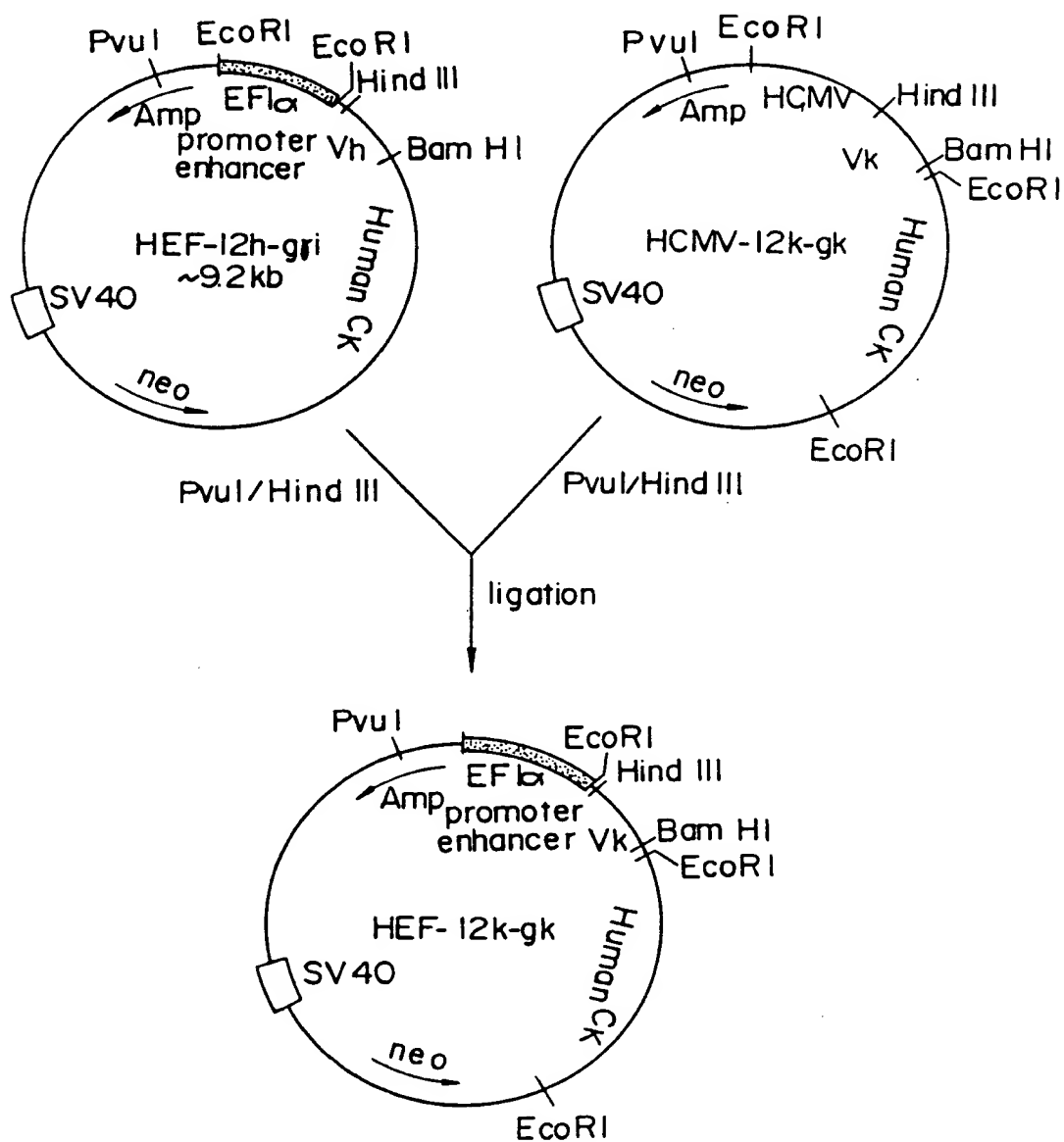
8/24

Fig.8



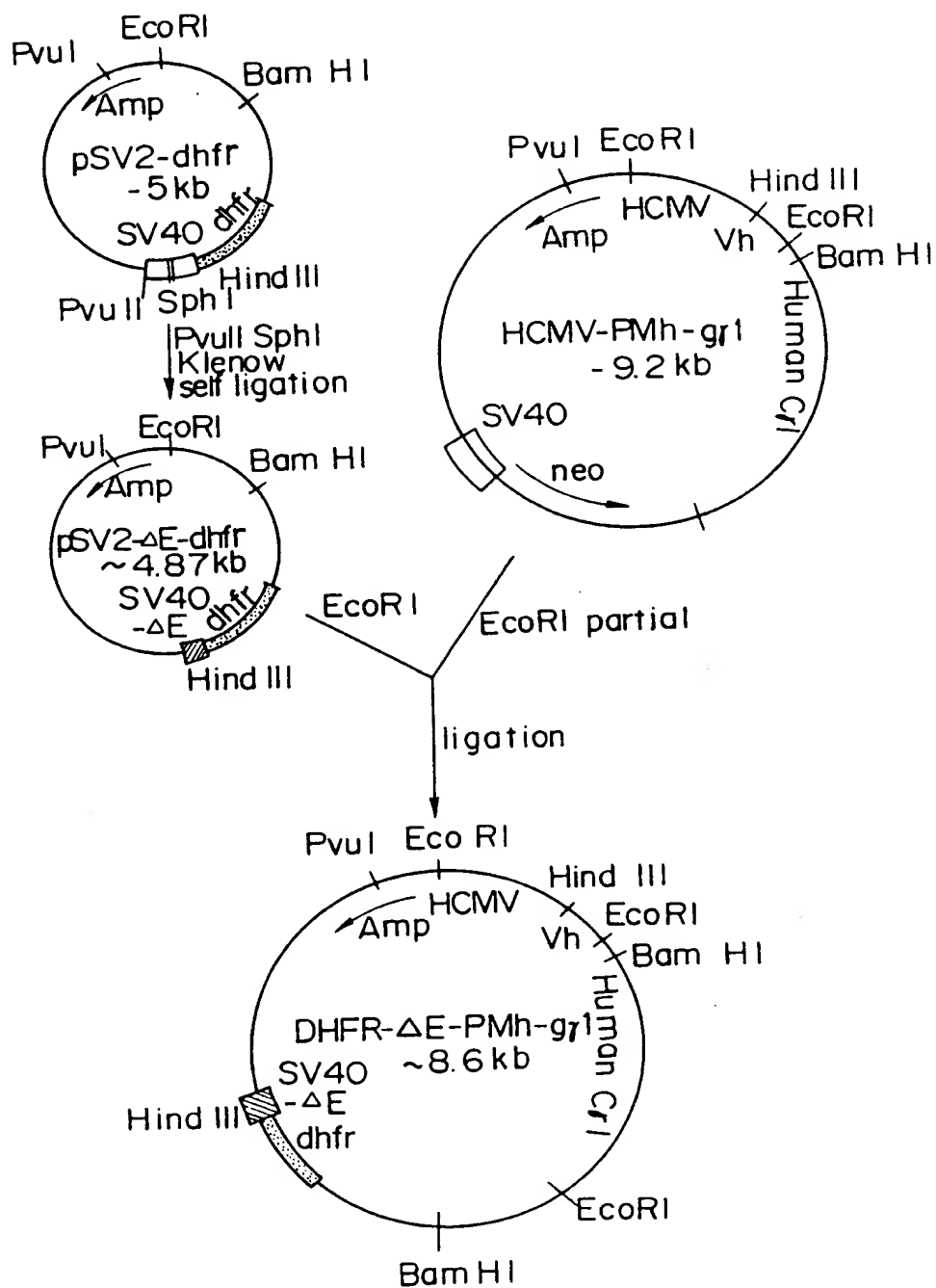
9/24

Fig.9



10/24

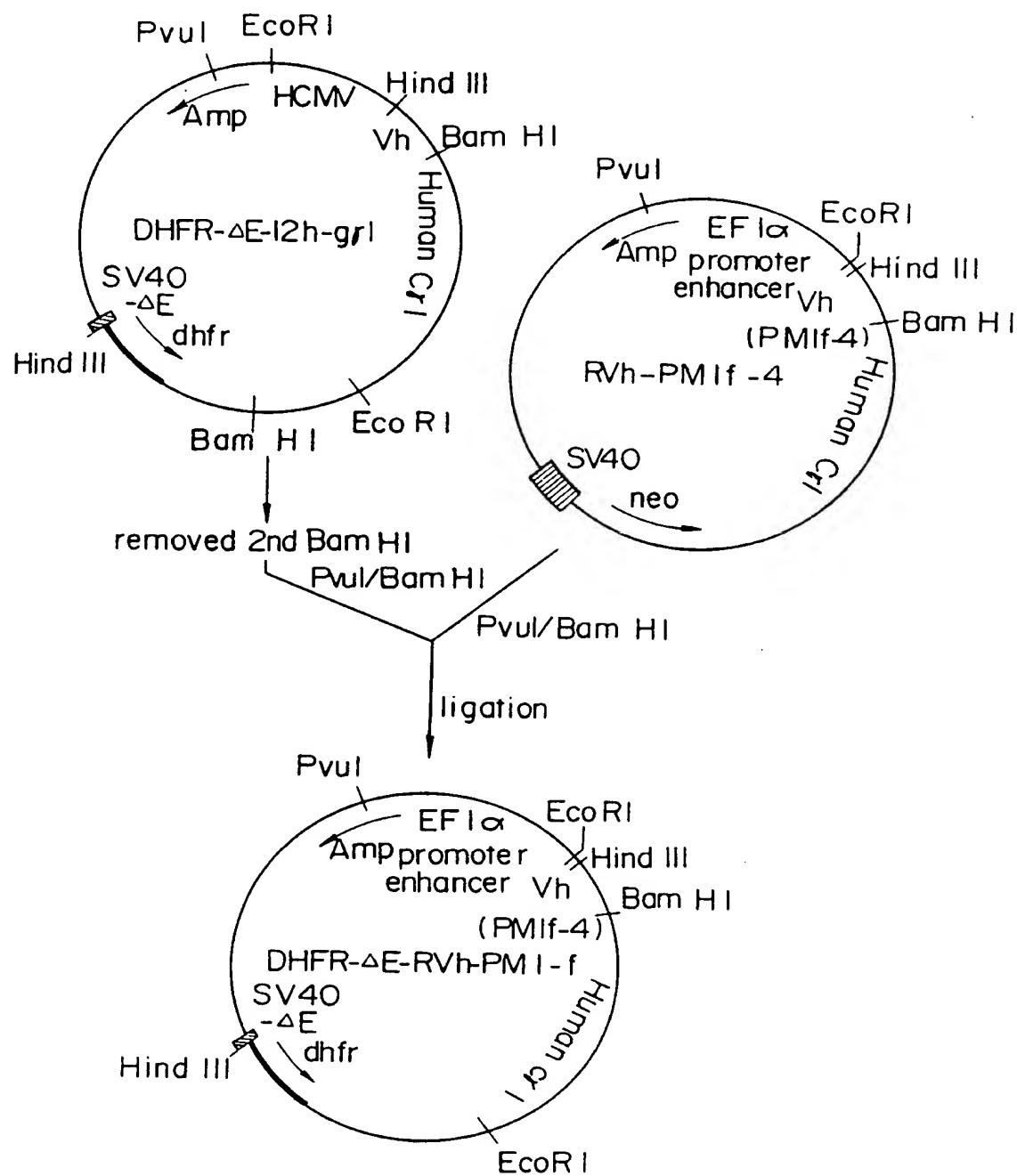
Fig.10





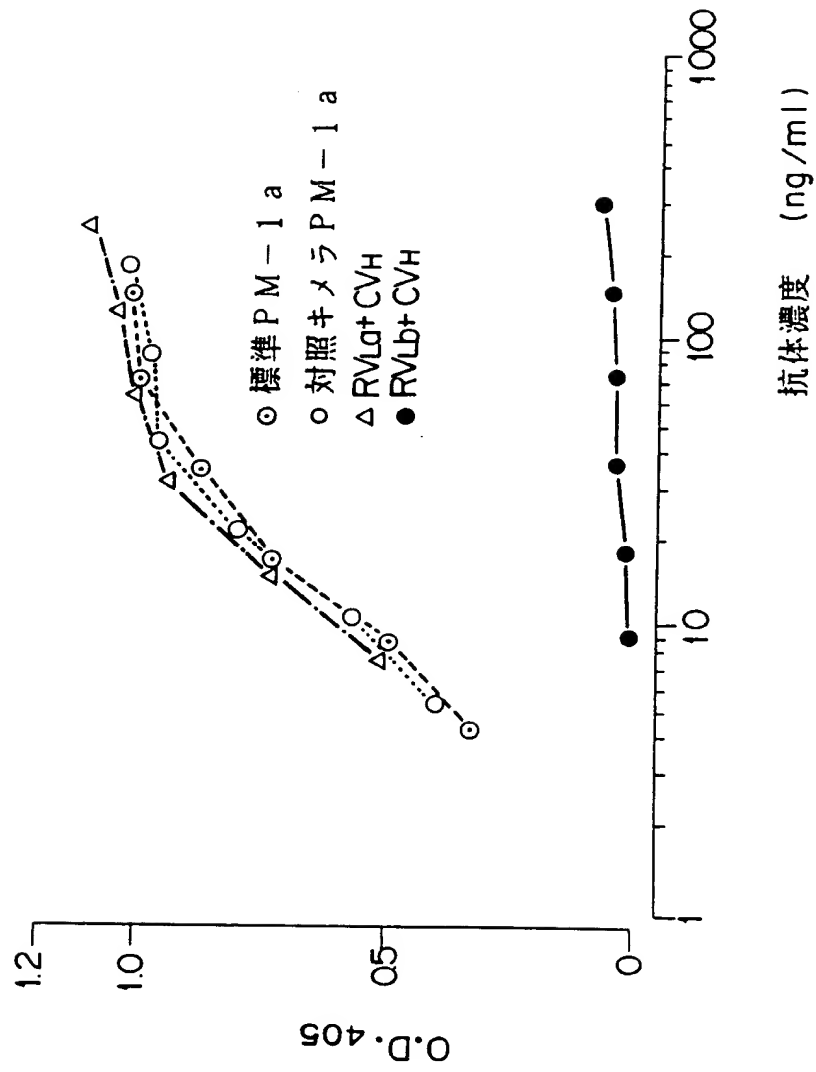
11/24

Fig.11



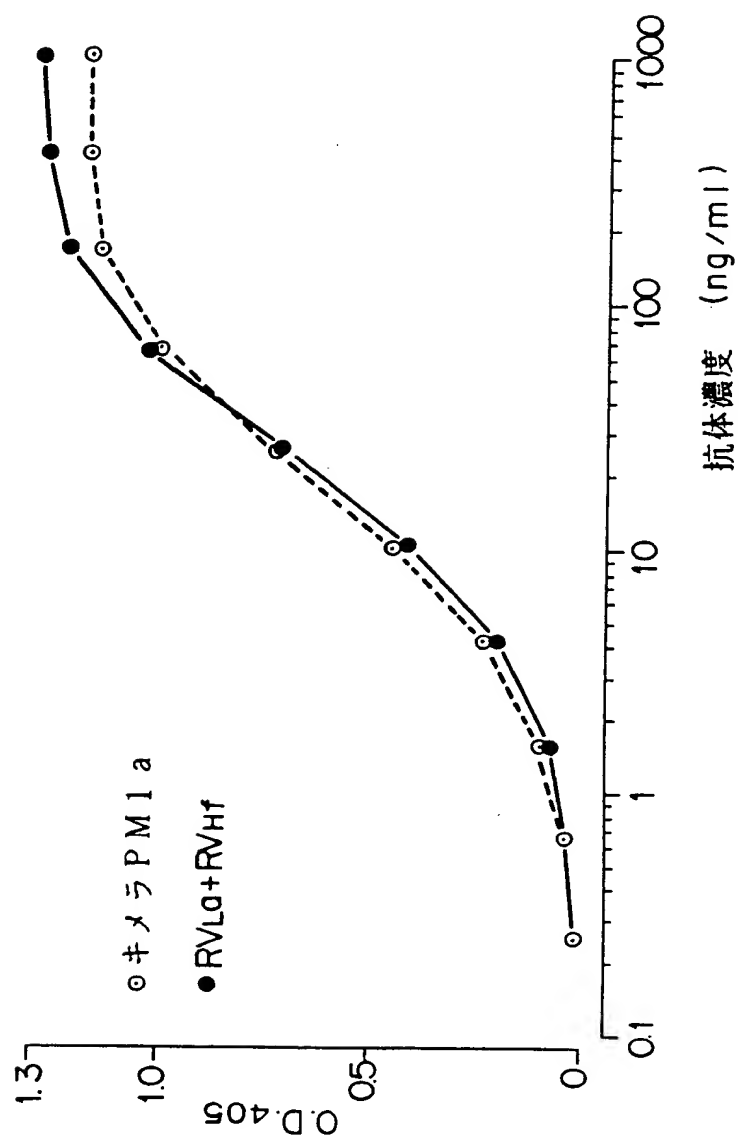
12/24

Fig.12



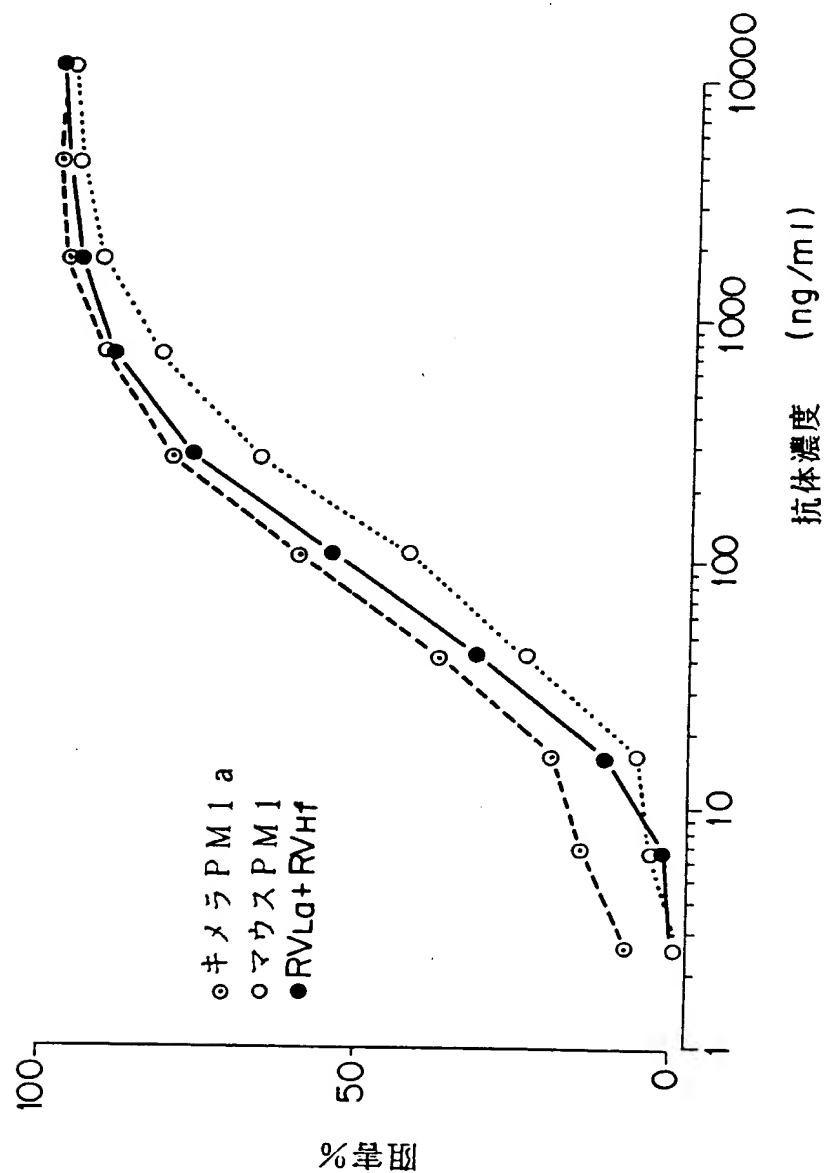
13/24

Fig.13



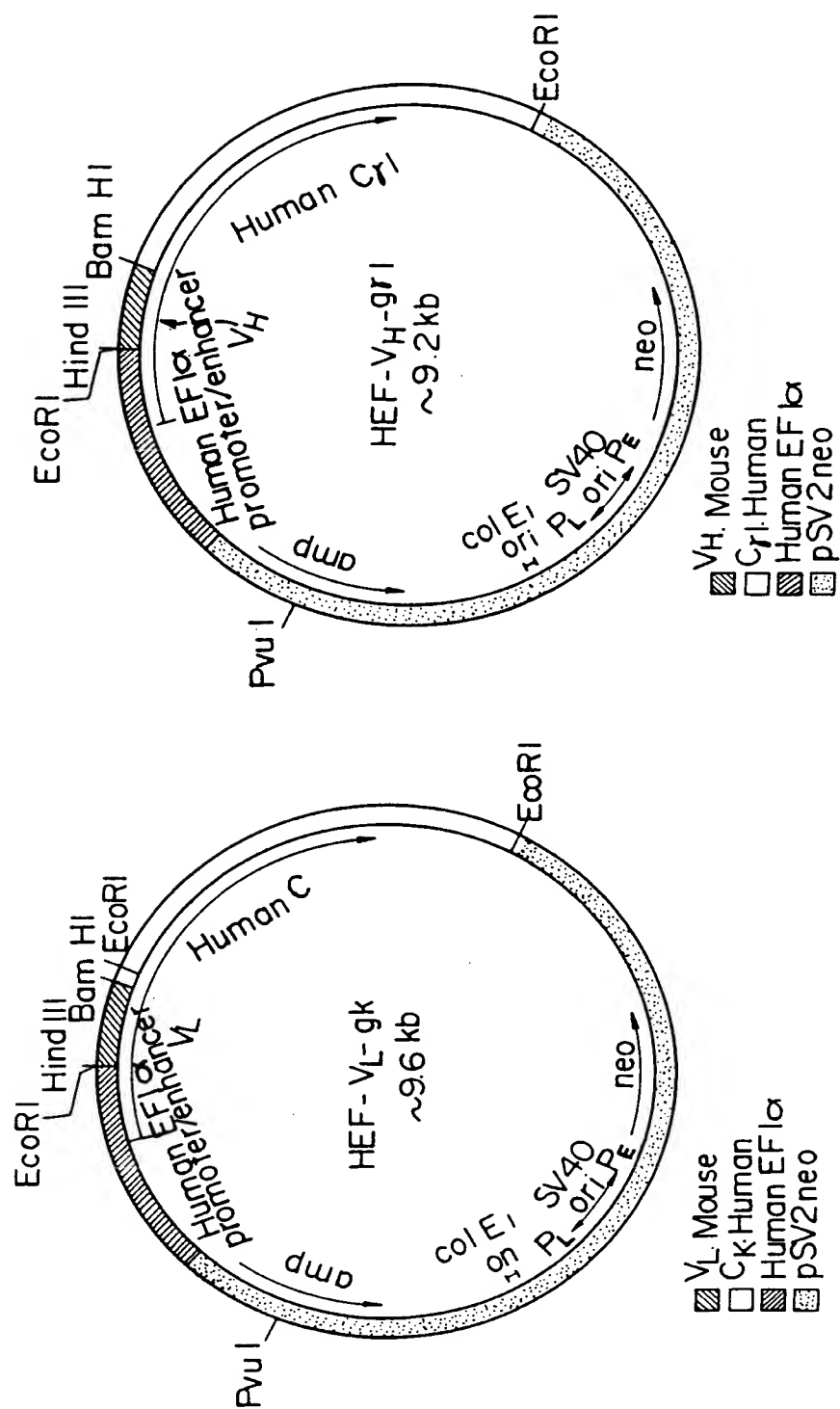
14/24

Fig.14



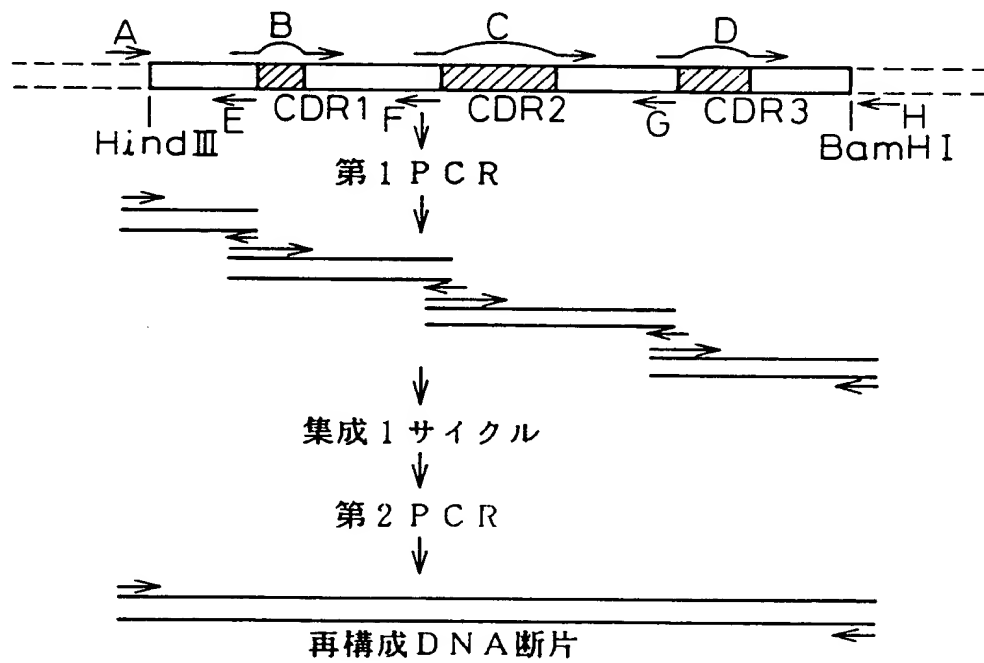
15/24

Fig.15



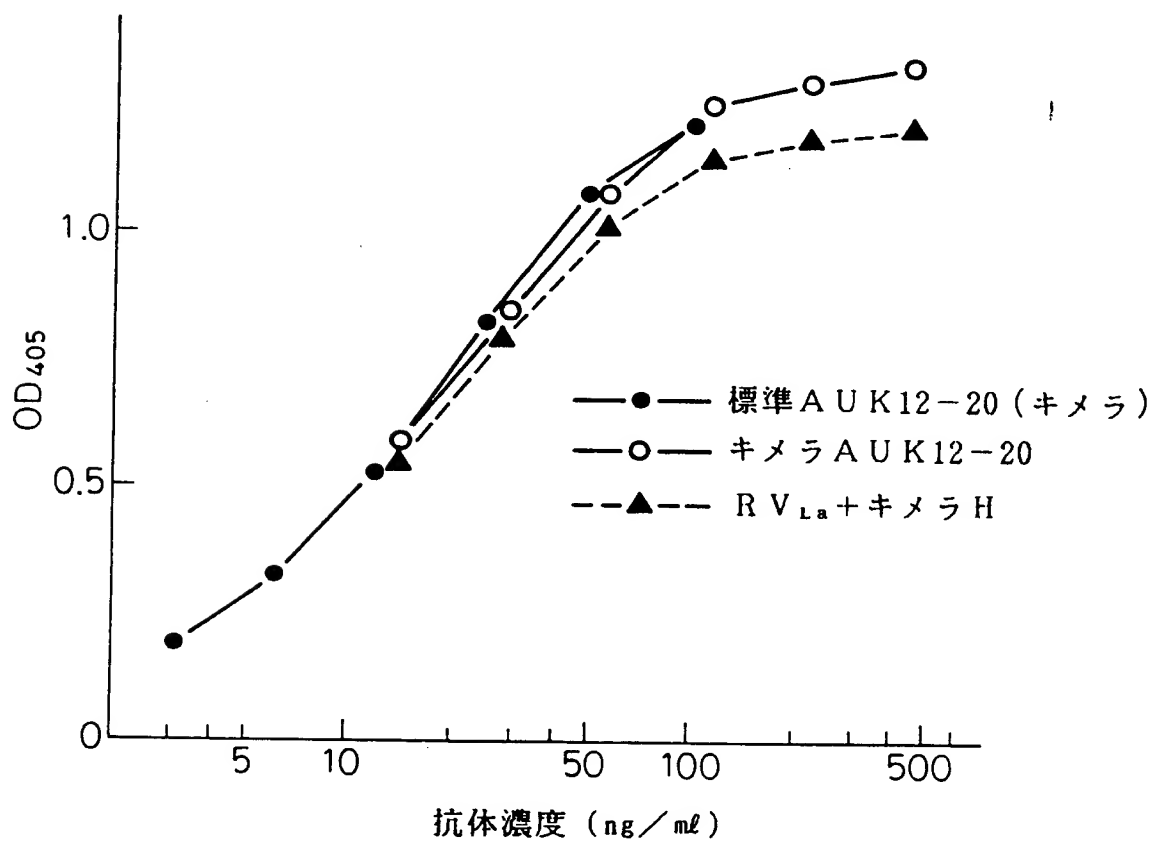
16/24

Fig.16



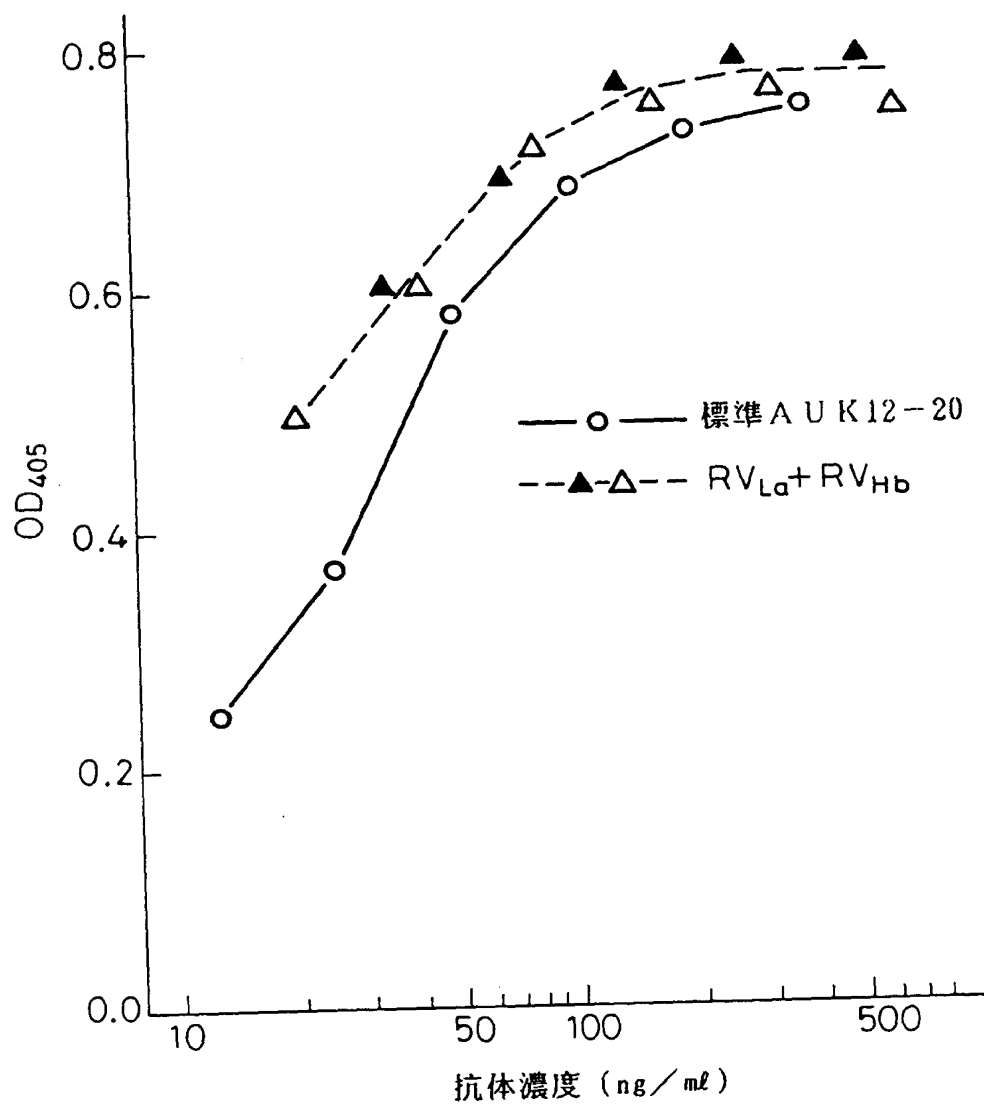
17/24

Fig.17



18/24

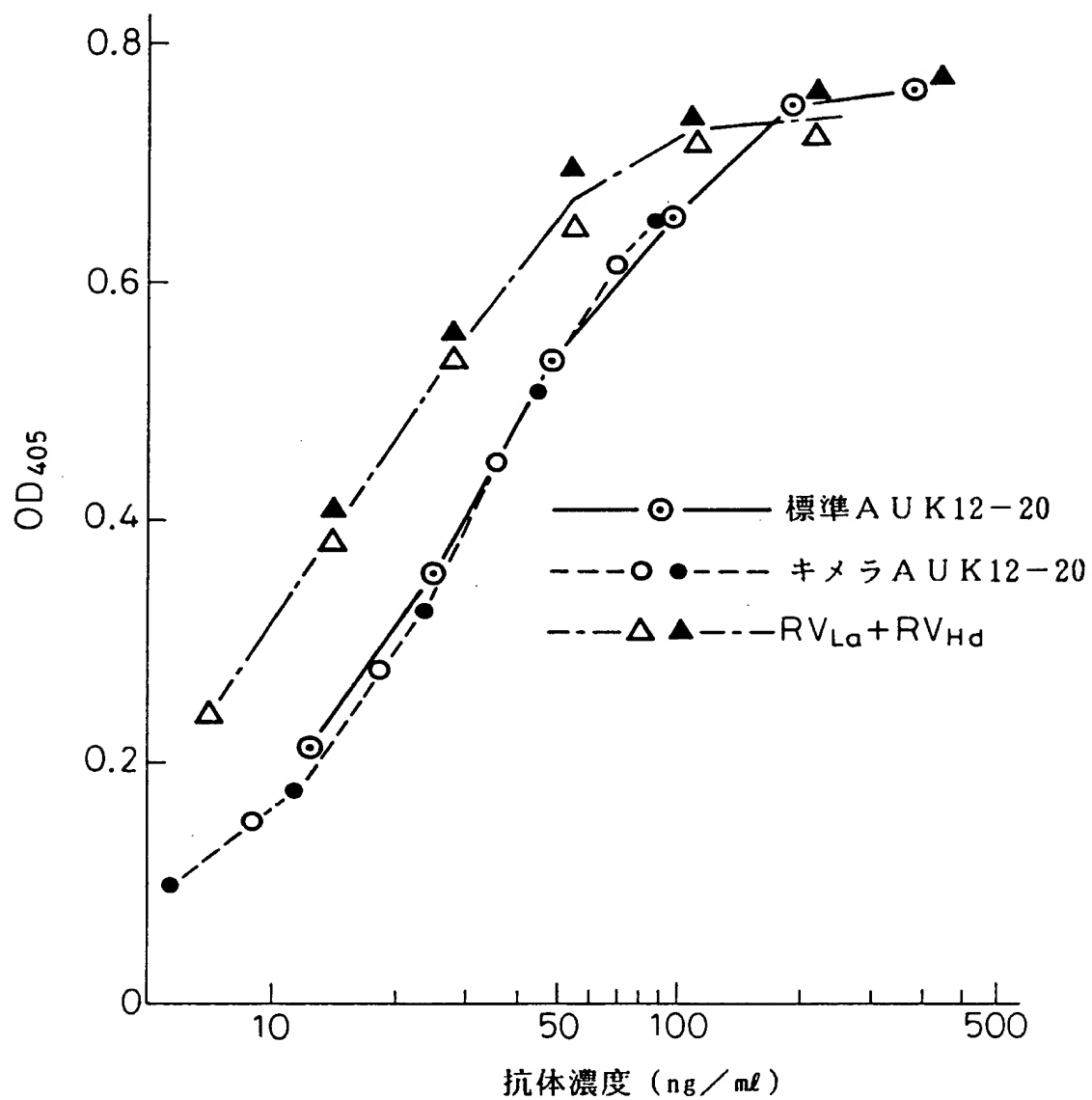
Fig.18





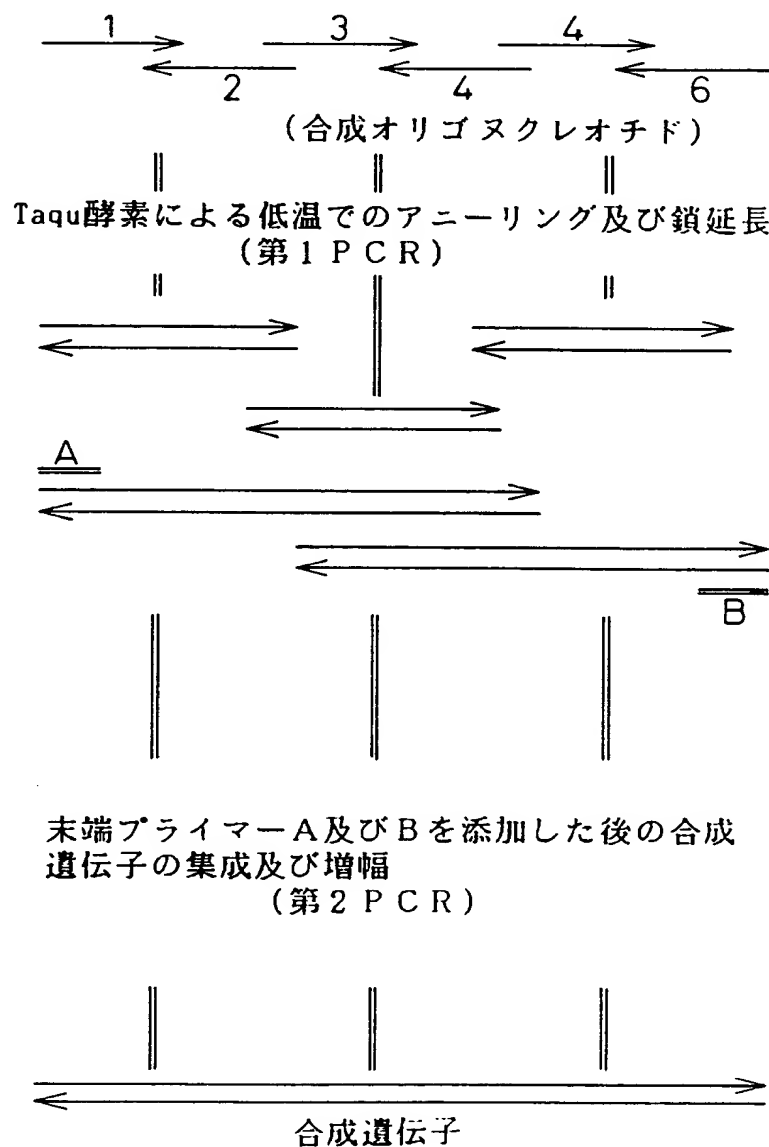
19/24

Fig.19



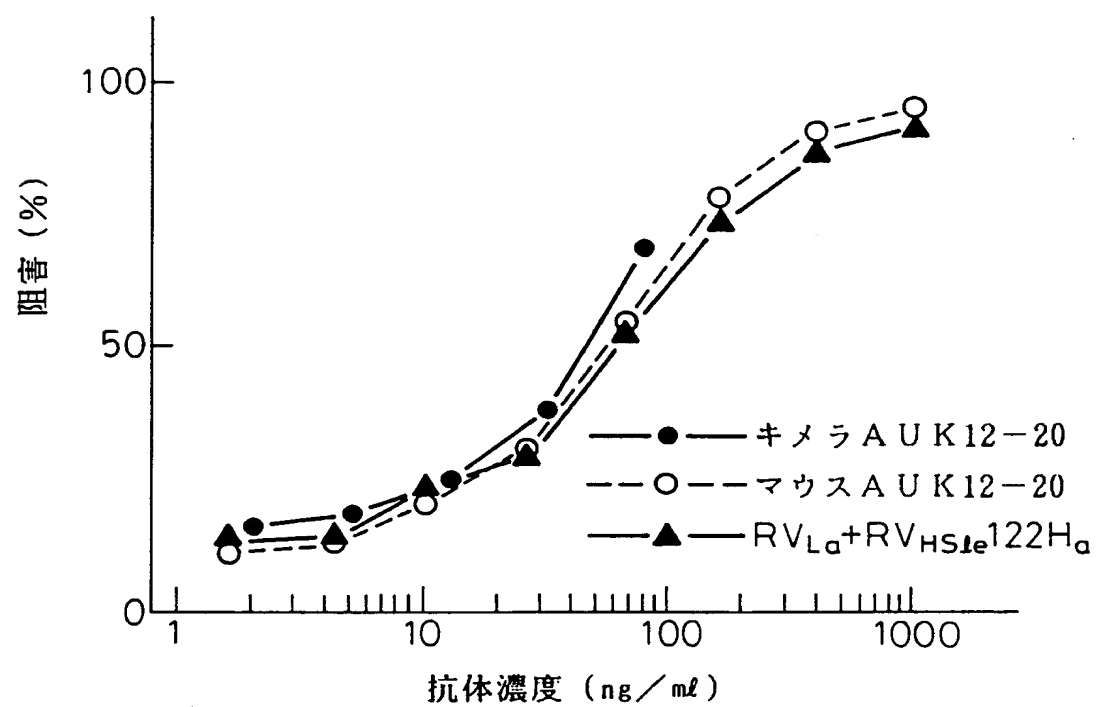
20/24

Fig.20



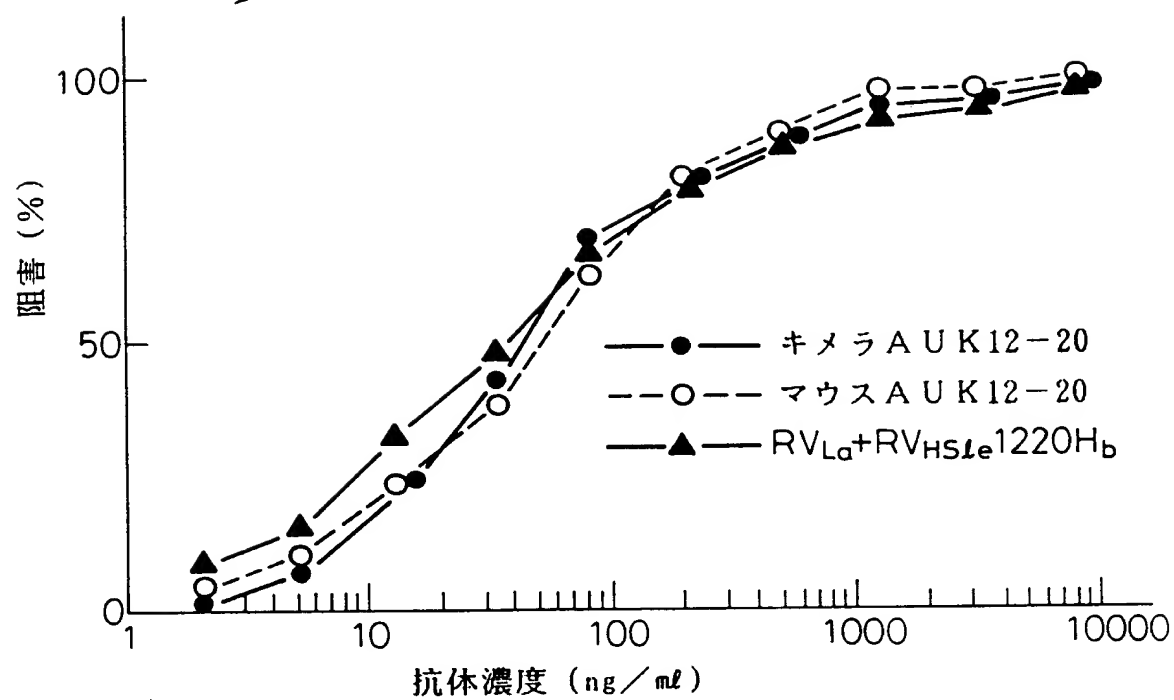
21/24

Fig.21



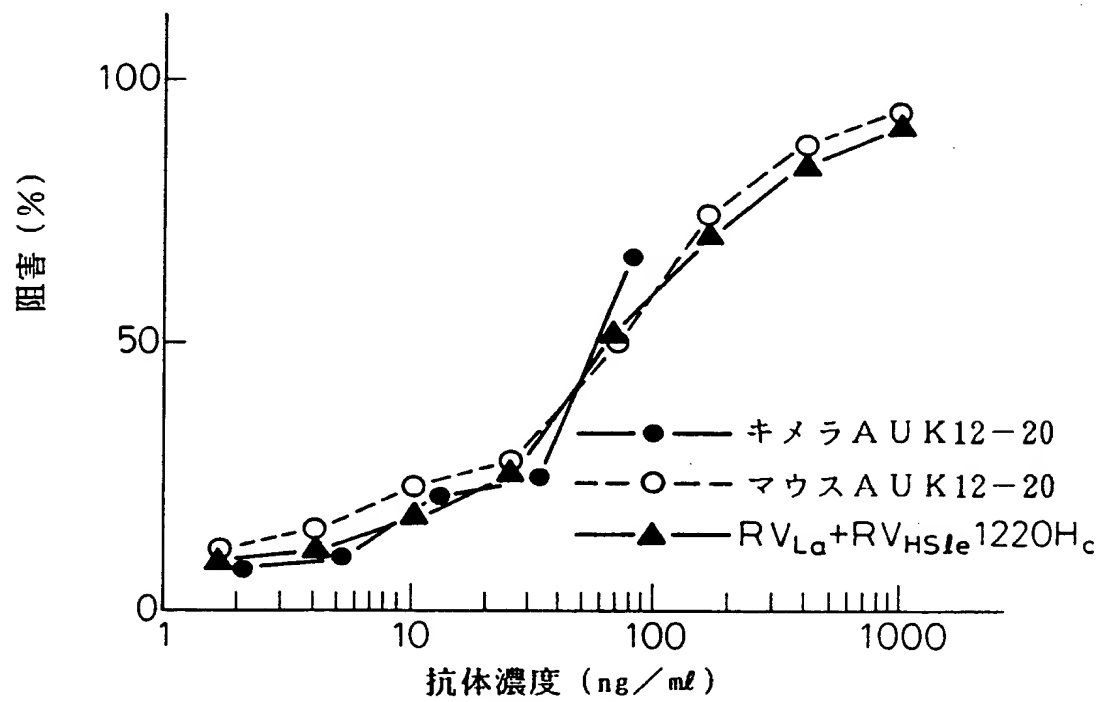
22/24

Fig.22



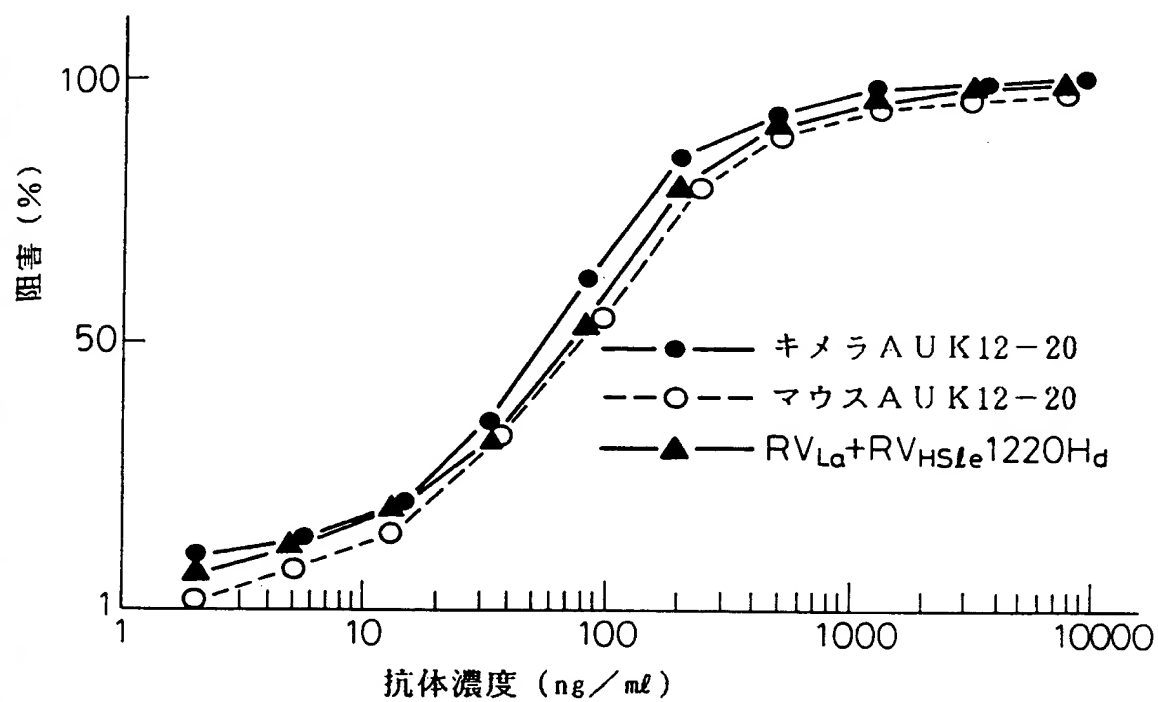
23/24

Fig.23



24/24

Fig.24



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00544

<b>I. CLASSIFICATION AND SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> C12P21/08, C07K15/28, C12N15/13//C12P21/00 (C12P21/08, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/12, 15/13, C07K15/28	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Journal of Immunology, Vol. 143, No. 9, (1989), Y. Hirata et al. "Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies" p. 2900-2906	1-64
Y	EP, A2, 409607 (Tadamitsu Kishimoto), January 23, 1991 (23. 01. 91), & JP, A, 3-139293 & CA, A, 2021594	1-64
Y	EP, A2, 413908 (Yeda Research and Development Ltd.), February 27, 1991 (27. 02. 91), & JP, A, 3-157400	1-64
Y	Nature, Vol. 312, (1984), G. L. Boulianne et al. "Production of functional chimaeric mouse/human antibody" p. 643-646	1-64
Y	JP, A, 61-47500 (Research Development Corporation of Japan), March 7, 1986 (07. 03. 86), & EP, A2, 171496	1-64
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search July 27, 1992 (27. 07. 92)		Date of Mailing of this International Search Report August 18, 1992 (18. 08. 92)
International Searching Authority Japanese Patent Office		Signature of Authorized Officer

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	JP, A, 62-500352 (Celltech Ltd.), February 19, 1987 (19. 02. 87), & WO, A1, 86/1533 & EP, A1, 194276 & GB, A, 2177096	1-64
Y	JP, A, 62-296890 (Gregory Poel Winter), December 24, 1987 (24. 12. 87), & EP, A2, 239400 & GB, A, 2188638	7-34, 43-60, 64

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC)			
Int. Cl. <sup>5</sup> C12P21/08, C07K15/28, C12N15/13/C12P21/00 (C12P21/08, C12R1:91)			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
I P C	C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/12, 15/13, C07K15/28		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)			
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		請求の範囲の番号
Y	Journal of Immunology, 第143巻, 第9号, (1989), Y. Hirata et al. "Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies" p. 2900-2906		1-64
Y	EP, A2, 409607 (Tadamitsu Kishimoto), 23. 1月. 1991 (23. 01. 91), &JP, A, 3-139293&CA, A, 2021594		1-64
Y	EP, A2, 413908 (Yeda Research and Develop- ment Ltd.), 27. 2月. 1991 (27. 02. 91), &JP, A, 3-157400		1-64
Y	Nature, 第312巻, (1984), G. L. Boulianne et al. "Production of functional chimaeric		1-64
※ 引用文献のカテゴリー			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの			
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの			
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)			
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献			
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献			
「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの			
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの			
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの			
「&」 同一パテントファミリーの文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
27. 07. 92		18.08.92	
国際調査機関		権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)		4 B 8 2 1 4	
		特許庁審査官	
		内 田 俊 生	

第2ページ 続く情報

( Ⅲ欄の続き )

mous / human antib dy" p. 643-646

Y JP, A, 61-47500 ( 新技術開発事業団 ),  
7. 3月. 1986 ( 07. 03. 86 ),  
&EP, A2, 171496

1-64

Y JP, A, 62-500352 ( セルテック リミテッド ),  
19. 2月. 1987 ( 19. 02. 87 ),  
&WO, A1, 86 / 1533 &EP, A1, 194276  
&GB, A, 2177096

1-64

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。  
☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

Ⅲ. 関連する技術分野に関する文献 (第2ページからの続き)		
引用文献の 番号	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, A, 62-296890 (グレゴリー ボール ウインター), 24. 12月 1987 (24. 12. 87), &EP, A2, 239400 & GB, A, 2188638	7-34, 43-60, 64